

Etablierung und Analyse menschlicher *GLI3* Mutationen
in embryonalen Stammzellen der Maus und in Mäusen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jens Böse

aus Langenhagen

2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ulrich Rüther

Korreferent: Prof. Dr. Uwe A.O. Heinlein

Tag der mündlichen Prüfung: 08. November 2001

Meiner Familie

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther für die Überlassung des Themas und die Betreuung und Unterstützung während meines Aufenthaltes in seiner Arbeitsgruppe bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe A.O. Heinlein bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Katrin Götz und Angela Egert für wertvolle Hilfestellungen.

Besonders dankbar bin ich meinem Freund und Kollegen Lars Grotewold.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AER	Apikale ektodermale Leiste
Amp ^R	Ampicilinresistenz
AP	Alkalische Phosphate
A/P	Antero-posterior
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	X-phosphat/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
c	Zenti-(10 ⁻²)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA
Ci	Curie (Einheit der Zerfallsaktivität)
cm	Zentimeter
cpm	Radioaktiver Zerfall pro Minute
D	Tag
d	Desoxy-
d	dorsal
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
dist.	distal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphatgemisch
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Tag der Embryonalentwicklung
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENU	N-Ethyl-N-Nitroso-Harnstoff
FCS	Fötale Kälberserum
FLU	Fluoreszein
x g	Erdbeschleunigung; g = 9,81 m/s
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HCl	Salzsäure

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
K	Kilo- (10 ³)
Kan ^r	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
m	milli- (10 ⁻³)
m	Meter
M	Molar (mol/L)
MESH	β-Mercaptoethanol
min.	Minute
Mol	Mol (6,023 x 10 ²³ Teilchen)
n	Absolute Anzahl
n	nano- (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid
Neo ^r	Neomycinresistenz
OD	Optische Dichte
³² p	Radiaktives Phosphorisotop der Atommasse 32
p	pico (10 ⁻¹²)
p	posterior
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
prox.	proximal
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TB	Transformationspuffer
TE	Tris-EDTA
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
v	ventral
V	Volt

Vol.

v/v

w/v

X-Gal

ZPA

Volumen

Volumen pro Volumen

Gewicht pro Volumen

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Zone polarisierender Aktivität

1	Einleitung.....	1
1.1	Der Hedgehog-Signalweg	1
1.2	Die Gene der Gli-Familie.....	7
1.2.1	Funktionen der Gli-Proteine während der Entwicklung und im Hh-Signalweg.....	7
1.2.2	Funktionen der Gli-Proteine außerhalb des Hh-Signalweges	12
1.2.3	Gli3 Mutationen in der Maus.....	14
1.2.4	Die Beteiligung von GLI3 an menschlichen Fehlbildungserkrankungen ...	17
1.3	Die Erzeugung und Verwendung von Tiermodellen	21
1.3.1	Erzeugung von Mausmutanten	22
1.3.2	Verwendung von Mausmutanten	24
1.4	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	27
2	Material und Methoden.....	30
2.1	Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	30
2.2	Dephosphorylierung von DNA.....	30
2.3	Umwandlung von überhängenden kohäsiven Enden in stumpfe Enden.....	31
2.4	Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung	31
2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	31
2.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.8	Transformation von Plasmiden in Escherichia coli	33
2.8.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	33
2.8.2	Transformation.....	33
2.9	Präparation von Plasmid-DNA.....	34
2.9.1	Plasmid-Mini-Isolation.....	34
2.9.2	Plasmid-Maxi-Isolation.....	35
2.10	Isolierung von Nukleinsäuren aus eukaryontischen Zellen und Geweben	36
2.10.1	Isolierung von DNA aus Schwanzgewebe und extraembryonalen Membranen	36
2.10.2	DNA Mikroextraktion aus 96-Loch Platten	36
2.10.3	Isolierung von RNA aus embryonalen Geweben	37
2.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.12	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	38
2.12.1	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	38
2.12.2	PCR-Amplifikation	39
2.12.3	Reverse Transkription	39
2.13	DNA-Sequenzierungen	39
2.14	Hybridisierungstechniken	40
2.14.1	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden.....	40
2.14.2	Filterhybridisierung von DNA.....	40

2.15	„Whole mount“ in situ Hybridisierung	41
2.15.1	Synthese der Antisense-RNA-Sonde	42
2.15.2	Vorbehandlung und Hybridisierung.....	42
2.15.3	Entfernung unspezifisch gebundener Sonde und Antikörperinkubation	43
2.15.4	Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper und Histochemie	44
2.15.5	Modifizierte Prozedur für in situ Hybridisierung auf Paraffindünnschnitten	45
2.16	„Whole mount“ Immunohistochemie	46
2.17	Knochen-Knorpel-Färbung	47
2.18	Histologische Techniken.....	47
2.18.1	Paraffindünnschnitte	47
2.18.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	48
2.18.3	Vibratomschnitte.....	49
2.19	Nachweis des programmierten Zelltods (Apoptose)	49
2.19.1	Apoptose-Detektion auf Paraffindünnschnitten	49
2.19.2	„Whole mount“ Apoptose-Detektion.....	50
2.20	Zellkulturtechniken.....	52
2.20.1	Zelllinien.....	52
2.20.1.1	MEF (embryonale Mausfibroblasten)	52
2.20.1.2	ES 14-1 (embryonale Stammzellen der Maus)	54
2.20.2	Passagieren von Zellen.....	54
2.20.3	Zellzahlbestimmung.....	55
2.20.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	55
2.20.5	Mutagenese-Ansatz in embryonalen Stammzellen der Maus.....	56
2.21	Tierexperimentelle Verfahren	59
2.21.1	Erzeugung von ES-Zell Chimären	59
2.21.1.1	Blastozysten-Injektion.....	59
2.21.1.2	Embryo (Morula)-Aggregation.....	60
2.21.1.3	Blastozysten-Transfer.....	61
2.21.2	Tierhaltung.....	61
2.21.3	Isolierung definierter Embryonalstadien.....	61
2.21.4	Identifikation genetisch veränderter Tiere und Embryonen.....	62
2.22	Fotodokumentation	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Konstruktion der Mutagenese-Vektoren.....	63
3.1.1	Isolierung genomischer Fragmente	63
3.1.2	Partielle Restriktionskartierung des Gli3-Lokus.....	63
3.1.3	Intron-Exon-Struktur des Maus Gli3-Gen.....	64
3.1.4	Sequenzvergleich zwischen dem humanen GLI3 und murinen Gli3.....	65
3.1.5	Herstellung der einzelnen Mutagenese-Vektoren.....	65

3.2	Stabile Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen und Identifizierung homolog rekombinanter Klone.....	69
3.2.1	Verwendung des Vektors pGli3 ^{neo/tk}	70
3.2.2	Verwendung des Vektors pGli3 ^{mPHS} und pGli3 ^{mPAP-A}	73
3.2.3	Verwendung des Vektors pGli3 ^{mPHS-neoflox}	75
3.2.4	Verwendung des Vektors pGli3 ^{mPAP-A-neoflox}	77
3.3	Generierung von chimären Mäusen.....	80
3.3.1	Verwendung der Gli3 ^{neo/tk} -ES-Zelllinie zur Herstellung chimärer Mäuse	80
3.3.2	Verwendung der Gli3 ^{mPHS-neoflox} -ES-Zelllinie zur Herstellung chimärer Mäuse	81
3.3.3	Verwendung der Gli3 ^{mPAP-A-neoflox} -ES-Zelllinie zur Herstellung chimärer Mäuse	81
3.4	Phänotypische Untersuchung der chimären Tiere	81
3.5	Testkreuzung auf Keimbahntransmission	82
3.6	Phänotypische Analyse der heterozygoten Gli3 ^{neo/tk/+} -Tiere	84
3.7	Charakterisierung des Gli3 ^{neo/tk} -Transkripts	86
3.8	Analyse der homozygoten Gli3 ^{Δ699} -Tiere.....	89
3.8.1	Das äußere Erscheinungsbild der Gli3 ^{Δ699/Δ699} -Tiere	90
3.8.2	Untersuchung des Skeletts von Gli3 ^{Δ699/Δ699} -Embryonen.....	91
3.8.3	Gliedmaßen-Phänotyp	95
3.8.4	Untersuchung der inneren Organe	103
3.8.5	Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems	111
3.9	Vergleichende phänotypische Untersuchung von Gli3 ^{Δ699/Δ699} - und Gli3 ^{XtJ/Δ699} -Embryonen	114
3.10	Zusammenfassung der beobachteten phänotypischen Veränderungen und vergleichende Betrachtung der beschriebenen Veränderungen in Gli3 ^{Δ699} -Mäusen und Pallister-Hall Syndrom-Patienten.....	117
4	Diskussion.....	120
4.1	Die Etablierung der ES-Zelllinien	122
4.2	Generierung von chimären Mäusen mit den etablierten ES-Zellklonen.....	124
4.3	Die Gli3 ^{Δ699} -Mauslinie	126
4.3.1	Die Auswirkungen der gezielten Mutagenese auf das Gli3-Transkript	126
4.3.2	Die heterozygoten Gli3 ^{Δ699} -Tiere	127
4.3.3	Die homozygoten Gli3 ^{Δ699} -Tiere	129
4.4	Die Untersuchung der Gli3 ^{Δ699/XtJ} -Tiere	138
4.5	Die Gli3 ^{Δ699/Δ699} -Mausmutante als Modell für das Pallister-Hall Syndrom.....	138
4.6	Das Gli3 ^{Δ699} -Protein und seine Funktion.....	141
5	Zusammenfassung.....	143
	Literatur	145

1 Einleitung

Die Entwicklung eines vielzelligen Organismus (Embryogenese) beginnt mit der Befruchtung der Eizelle, die sich zunächst durch eine Vielzahl von Teilungen in eine scheinbar ungeordnete Ansammlung von Zellen verwandelt. Dieses Zellaggregat entwickelt sich dann durch kontrollierte Zellteilungen, Zellwanderungen, Differenzierung, Musterbildung und Organogenese zu einem wohl geordneten Embryo, der schnell die Form und das strukturierte Muster des endgültigen Organismus erkennen läßt (WOLPERT, L 1971). Die Untersuchungen dieser Prozesse in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus*, *Gallus gallus* und *Mus ssp.* legen nahe, daß die Entwicklung vielzelliger Lebewesen maßgeblich durch Zell-Zell-Kommunikation und -Interaktion gesteuert und überwacht wird. Während aller Stadien der Entwicklung beeinflussen Zellen durch das Aussenden und Empfangen von extrazellulären Signalen gegenseitig ihr Verhalten und Schicksal im Organismus (instruktive und permissive Interaktion). Eine der erstaunlichsten Entdeckungen der letzten Dekaden war, daß trotz der unzähligen und verschiedenartigen Zellsignale nur ein relativ kleines Repertoire der im Genom vorhandenen Gene bzw. ihrer Genprodukte als hierarchisch geordnetes System von Signalmolekülen eingesetzt wird. Von zentraler Bedeutung für diese Vorgänge embryonaler Zell-Zell-Kommunikation sind demnach vorallem die sekretierten Peptidmoleküle der EGF- (Epidermal growth factor), FGF- (Fibroblast growth factor), Wnt-, TGF β - (Transforming growth factor- β) und Hedgehog- (Hh) Familien (Übersicht bei KINGSLEY, D.M. 1994; MASON, I.J. 1994; HAMMERSCHMIDT, M. ET AL. 1997; SCHWEITZER, R. UND SHILO, B.-Z. 1997; WODARZ, A. UND NUSSE, R. 1998).

1.1 Der Hedgehog-Signalweg

Das *Hedgehog* (Hh)-Gen wurde zuerst bei der Suche nach Segment-Polaritäts-Mutationen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (NÜSSLEIN-VOLHARD, C. UND WIESCHAUS, E. 1980). Später zeigte sich, daß der intrazelluläre Signalweg des Morphogens Hedgehog für die Entwicklung von vielzelligen Organismen von zentraler Bedeutung ist. In *Drosophila* ist er an der Musterbildung von Segmenten, Flügeln, Beinen, den Augen und Teilregionen des Gehirns beteiligt. In Vertebraten ist eines der drei Hh-Homologen, Sonic Hedgehog (Shh), neben seinen beiden Verwandten Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh), für die Spezifikation der Links-Rechts-Asymmetrie, der Musterbildung des ventralen Neuralrohres, der benachbarten Somiten, der Extremitäten, der Augen, Zähne, Haare, Lunge und des Gastrointestinaltraktes wichtig. Aufgrund der

enormen Vielzahl von Ereignissen während der Entwicklung von Vertebraten und von *Drosophila* an denen Hedgehog-Moleküle beteiligt sind und seiner enormen Potenz auf die Musterbildung einzelner Organe einzuwirken, die z.B. eindrucksvoll bei der Ausbildung von Polydaktylien in der Maus durch eine Fehlexpression von *Shh* deutlich werden, muß die Synthese und Verteilung des Hedgehog-Proteins sowie die Reaktion von Zellen auf dieses Signal streng reguliert werden (Übersicht bei LAWRENCE, P.A. UND STRUHL, G. 1996; NEUMANN, C. UND COHEN, S 1997; INGHAM, P.W. 1998; RUIZ I ALTABÁ, A. 1999; KALDERON, D. 2000; MCMAHON, A.P. 2000).

Als Signalmolekül gelangt das Hh-Protein nach seiner Synthese auf den sekretorischen Pfad innerhalb der Zelle. Als Ergebnis einer intramolekularen Spaltung und Lipid-Modifikation, die durch das carboxy-terminale Ende des Präproteins katalysiert wird, entsteht ein amino-terminales Peptid, das an seinem C-Terminus an Cholesterol gebunden und an der Zelloberfläche verankert ist (PORTER, J.A. ET AL. 1996). Diese Cholesterol-Modifikation scheint unter anderem dafür wichtig zu sein, daß das Hh-Signal an ein „Auslieferungssystem“ übergeben wird. Dieses System beinhaltet das Patched-verwandte Multi-transmembran-Domänen Protein Dispatched und Tout-velu (Ttv), ein Mitglied der EXT-Familie der Glykosyl-Transferasen, das an der Heparansulfat-Biosynthese beteiligt ist. Diese beiden scheinen für die effiziente Sekretion von Hh aus den produzierenden Zellen notwendig und für den effizienten Transport des Hh-Protein-Signals und die Antwort auf dieses mitverantwortlich zu sein (BAEG, G.-H. UND PERRIMON, N. 2000; BURKE, R. ET AL. 1999). In der Maus konnte in der sich entwickelnden Gliedmaßenknospe die wichtige Funktion der Cholesterol-Modifikation des Shh-Proteins gezeigt werden. Während der Gliedmaßenentwicklung ist das posterior lokalisierte Signalzentrum, die „zone of polarising activity“ (ZPA) entscheidend für die Ausbildung der anterior-posterioren (AP) Polarität der Vertebraten-Extremität (Übersicht bei PEARSE, R.V. UND TABIN, C.J. 1998). Diese ZPA ist die Quelle für ein Morphogen, das über weite Entfernung in der sich entwickelnden Gliedmaßenknospe in der Lage ist, durch den Aufbau eines Konzentrationsgradienten spezifische Skelettelemente zu induzieren. Als Konsequenz bilden sich im Bereich der geringsten Konzentration der Finger 1 und im Bereich der höchsten Morphogenkonzentration die Finger 4 und 5 (WOLPERT, L. 1989). Aufgrund einer Vielzahl von Hinweisen wird davon ausgegangen, daß Shh als dieses Morphogen der ZPA der primär determinierende Faktor für die Ausbildung der AP-Polarität ist (Übersicht bei YANG, Y. ET AL. 1997). Die Verknüpfung von Shh mit Cholesterol ist für die Ausübung dieser Funktion essentiell, da sie für die Signalwirkung des Shh-Proteins über große Distanzen (bis zu 30 Zelldurchmesser) notwendig ist, wohingegen sie für die

Wirkung über kurze Strecken vernachlässigbar ist. Ein nicht durch Cholesterol modifiziertes Shh-Signalmolekül verfügt ebenfalls über polarisierende Aktivität, ist aber im Gegensatz zu einem modifizierten in seiner Reichweite auf ein posteriores Gebiet der Gliedmaßenknospe beschränkt. Dies wird daran deutlich, daß sich die posterioren Finger (4 und 5) bilden, wohingegen es zu einem Verlust der Finger 2 und 3 kommt (LEWIS, P.M. ET AL. 2001). Die Ausbildung von Finger 1 ist kaum betroffen, da es sich um einen weitestgehend von Shh unabhängigen Prozeß zu handeln scheint (KRAUS, P. ET AL. 2001). Gleichzeitig scheint die Cholesterol-Modifikation wichtig zu sein, um das Hh-Protein in Cholesterol-reichen Mikrodomänen der Zellmembran anzureichern und dadurch eine effiziente Interaktion mit seinem Rezeptor Patched (Ptc) (siehe unten) zu erreichen. Es kann hierdurch zu einer hohen lokalen Konzentration von Hh-Protein in größerer Entfernung von der Quelle kommen, so daß es auch bei einer niedrigen Gesamtkonzentration des Signalmoleküls zu einer Antwort und zur Musterbildung kommen kann (LEWIS, P.M. ET AL. 2001). Die selben Erkenntnisse über die Aufgabe der Cholesterol-Modifikation des Hh-Proteins und ihre Notwendigkeit für die Signalaktivität über große Entfernungen konnte auch in einem *in vitro*-Zellkultursystem gewonnen werden (ZENG, X. ET AL. 2001).

Außerhalb der synthetisierenden und sekretierenden Zellen kommt es zu einer ersten Modulierung des Hh-Signals durch das von benachbarten Zellen exprimierte Membranglykoprotein Hip (Hedgehog-interacting protein). Hip ist in der Lage Hh zu binden, wodurch es die Anzahl der aktiven Hh-Moleküle verringert und somit abschwächend auf das Hh-Signal wirkt. Gleichzeitig wird dadurch die eigene Expression in Hh-abhängiger Weise negativ beeinflusst und ein Regelkreis aufgebaut (negativer Rückkopplungsmechanismus), der eine Feinabstimmung des Hh-Signals erlaubt (CHUANG, P.T. UND MCMAHON, A.P. 1999). Am Anfang der weiteren intrazellulären Übermittlung des durch das Hh-Protein ausgelösten Signals stehen zwei Multi-transmembran-Domänen Proteine, Patched (Ptc) und Smoothend (Smo), die einen heteromeren Rezeptor-Komplex bilden. In diesem Komplex reguliert Ptc die Stabilität, Membranansammlung und den Phosphorylierungsstatus von Smo (ALCEDO, J. ET AL. 2000; DENEFF, N. ET AL. 2000; INGHAM, P.W. ET AL. 2000; STRUTT, H. ET AL. 2001). In Abwesenheit von Hh, inhibiert Ptc die latente Signalaktivität von Smo, das hypophosphoryliert ist und schnell abgebaut wird. Durch die Bindung des Hh-Signalpeptids an seinen Rezeptor Ptc, die durch die Cholesterol-Modifikation erleichtert bzw. effizienter wird, wird dieser negative Einfluß aufgehoben, Smo ist hyperphosphoryliert, akkumuliert in der Zellmembran und es kommt zur Aktivierung von Smo (Übersicht bei ALCEDO, J. UND NOLL, M. 1997; ALCEDO, J. ET

AL. 2000; DENEFF, N. ET AL. 2000; INGHAM, P.W. ET AL. 2000; KALDERON, D. 2000; STRUTT, H. ET AL. 2001). Bisher wurde davon ausgegangen, daß die Aufhebung der Inhibition von Smo durch Ptc durch eine Veränderung der Konformation des Rezeptorkomplexes erreicht wird (STONE, D.M. ET AL. 1996). In neuerer Zeit erscheint es jedoch wahrscheinlicher, daß die Regulation von Smo durch Ptc von einem nicht-stöchiometrischen Mechanismus vermittelt wird. Hierbei könnte eine enzymatische Aktivität des Ptc-Proteins von entscheidender Bedeutung sein (DENEFF, N. ET AL. 2000). In einer bisher kaum verstandenen Weise wird die Smo-Aktivität intrazellulär weitergeleitet. Hieran sind verschiedene Komponenten eines multimeren zytoplasmatischen Mikrotubuli-assoziierten Komplexes, wie das Kinesin-ähnliche Protein Costal2 (Cos2), die Serin/Threonin-Proteinkinase Fused (Fu), Suppressor of Fused (Su(fu)), Protein Kinase A (PKA) und Slimb beteiligt (Übersicht bei INGHAM, P.W. 1998). Als Mitglied dieses Komplexes und letztem bekannten Schritt in der Vermittlung gelangt das Signal zu dem Zink-Finger Protein Cubitus interruptus (Ci), dem *Drosophila* Homolog der Vertebraten Gli-Proteine. Ci scheint schließlich den Großteil des Hh-Signal vom Cytoplasma in den Nukleus zu transferieren, wo es direkt die Transkription von Zielgenen reguliert (Übersicht bei AZA-BLANC, P. UND KORNBERG, T.B. 1999). Bei Abwesenheit des Hh-Signals wird Ci (Ci-155) in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus proteolytisch in eine 75kDa Repressorform (Ci-75) gespalten, die im Nukleus negativ auf die Transkription von Zielgenen (*hh* und *dpp*) einwirkt. Die Spaltung von Ci-155 in Ci-75 unterbleibt wenn das Hh-Signal anwesend ist. Als Folge hiervon steigt der Anteil an transient aktiviertem Ci-155 im Nukleus kurzfristig an und es agiert als transkriptionaler Aktivator.

Für die proteolytische Prozessierung von Ci sind mindestens drei der zuvor beschriebenen Komponenten erforderlich. Hierzu zählen PKA, Slimb und Cos2, da der Verlust einer dieser Komponenten zu einer Inhibition der Ci-Prozessierung und der Ansammlung von Ci-155 führt. Weiterhin ist Cos2 für die Inhibierung der Ci-Aktivität verantwortlich, indem es an eine 125 Aminosäuren große Domäne in der C-terminalen Region bindet und Ci damit im Cytoplasma verankert. Unter dem Einfluß von Hh und unter Vermittlung durch Fu kommt es schließlich zu einer verstärkten Translokation von Ci von Cytoplasma in den Nukleus. Dieser Prozeß wird jedoch durch Su(Fu), einen weiteren wichtiger Faktor in der Regulation der Ci-Aktivität, beeinflusst. Zum Einen wird der nukleäre Import von Ci direkt durch Interaktion von Su(Fu) mit einer N-terminalen Region von Ci verhindert und zum Anderen konnte eine das Ci-155 Protein inaktivierende und stabilisierende Funktion von Su(Fu) im Nukleus gezeigt werden. Unter dem anhaltenden Einfluß von Hh kommt es jedoch zur Auflösung dieses Komplexes und es entsteht das aktive instabile Ci-155, das die

transkriptionale Aktivierung der Zielgene (*dpp* und *wg*) vermittelt. Die aktivierende Wirkung wird nach Auslösung des Signals weiterhin streng kontrolliert, da für Ci ein aktiver Transport des Proteins aus dem Nukleus heraus gefunden wurde, der eine Begrenzung des Signals ermöglicht. Hierfür scheint eine kanonische Nukleus-Export-Sequenz innerhalb des Ci-Proteins verantwortlich zu sein. Gleichzeitig kommt es zum Aufbau eines negativen Rückkopplungsmechanismus, indem die Repression der Ptc-Expression aufgehoben wird und als Konsequenz die Ptc-Aktivität ansteigt. Durch die vermehrte Bindung werden die Hh-Signalpeptide schnell neutralisiert und die Wirkung des Hh-Signals wird begrenzt (CHEN, Y. UND STRUHL, G. 1996; AZA-BLANC, P. ET AL. 1997; CHEN, Y. ET AL. 1998; JIANG, J. UND STRUHL, G. 1998; OHLMEYER, J.T. UND KALDERON, D. 1998; CHEN, C.-H. ET AL. 1999; KOGERMAN, P. ET AL. 1999; METHOT, N. UND BASLER, K. 1999; WANG, Q.T. UND HOLMGREN, R.A. 1999; WANG, Q.T. UND HOLMGREN, R.A. 2000; WANG, G. ET AL. 2000). In Vertebraten scheinen die drei Gli-Proteine einer entsprechenden komplexen Regulation zu unterliegen und können ebenfalls aktivierende wie auch reprimierende Funktionen ausüben (siehe 1.2).

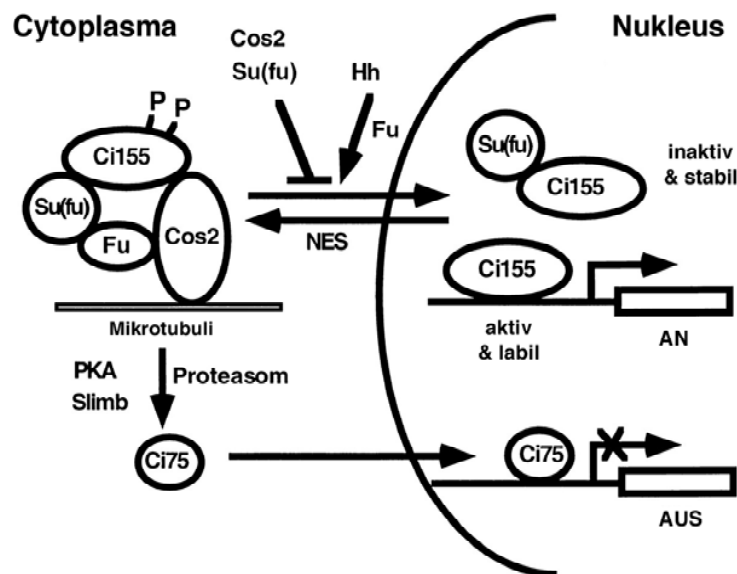


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Regulation der Ci-Aktivität. Die Prozessierung und der nukleäre Import von Ci sowie die transkriptionale Ci-Aktivität im Zellkern unterliegen einer vielstufigen Regulation. Im Zytoplasma verhindern Cos2 und Su(Fu) durch die Bindung an Ci die Translokation in den Zellkern. Dagegen wirkt Hh vermittelt durch Fu stimulierend auf den nukleären Import von Ci. Im Zellkern wird die Aktivität von Ci-155 durch Su(Fu) negativ beeinflusst. Unter dem anhaltenden Einfluß von Hh kommt es schließlich zur transienten Aktivität von Ci-155. Zusätzlich unterstützt Cos2 zusammen mit PKA, Slimb und dem Proteasom die Prozessierung von Ci im Zytoplasma. Das C-terminal verkürzte Ci (Ci-75) gelangt in den Nukleus und wirkt negativ auf die Expression von Hh-Zielgenen ein. (modifiziert nach WANG, G. ET AL. 2000)

Neben dem direkten Ablauf der Übermittlung des Hh-Signals mit Ci als terminalem Überträger der Information in den Nukleus gibt es einige experimentelle Befunde, die für eine Verzweigung des Hh-Signalweges und die Existenz weiterer Ci-unabhängiger Mechanismen der terminalen Hh-Signalübertragung sprechen (NÜSSLEIN-VOLHARD, C. ET AL. 1984; SLUSARSKI, D.C. ET AL. 1995; KRISHNAN, V. ET AL. 1997A, KRISHNAN, V. ET AL. 1997B; LESSING, D. UND NUSSE, R. 1998; LEWIS, K.E. ET AL. 1999; SUSUKI, T. UND SAIGO, K. 2000; GALLET, A. ET AL. 2000). Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, daß das Hh-Signal in jeder analysierten Situation obligatorisch über Ci vermittelt wird, so daß nicht von einer distalen Aufspaltung des Hh-Signalweges gesprochen werden kann (METHOT, N. UND BASLER, K. 2001). Ferner muß davon ausgegangen werden, daß alle eventuell existierenden Parallelwege unterhalb von Smo bei Ci zusammenlaufen müssen. Weiterhin konnte in diesem Zusammenhang deutlich gezeigt werden, daß Hh in der Abwesenheit von Ci keinerlei Einfluss auf die Expression von Zielgenen hat, wohingegen Ci in Abwesenheit von Hh sehrwohl auf die Expression von Zielgenen einwirkt. Dieser Einfluss kommt durch die Bildung der transkriptionalen Repressorform als Standardfunktion zustande (METHOT, N. UND BASLER, K. 2001).

Die für die normale Entwicklung essentielle und zentrale Bedeutung des Hh-Signalweges und der an ihm beteiligten Proteine wird nicht nur durch die evolutionäre Konservierung der einzelnen Komponenten und der Mechanismen der Signalübertragung deutlich, sondern auch durch die Vielzahl von beschriebenen Mutationen. Diese zum Teil in ihrer Entwicklung schwer betroffenen Mutanten betreffen alle Modellorganismen und finden teilweise ihre Entsprechungen in einer Vielzahl verschiedener menschlicher Erkrankungen.

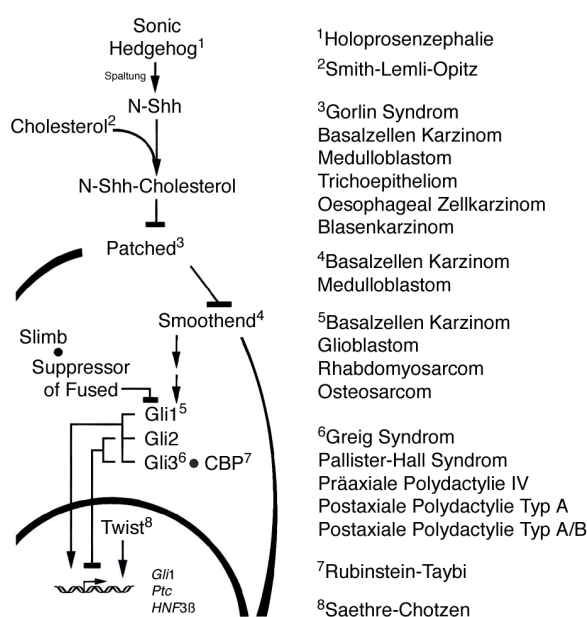


Abbildung 1.2: Die Assoziation menschlicher Erkrankungen mit Fehlfunktionen des SHH-Signalweges (vererbte oder sporadische Geburtsdefekte/Syndrome, Krebs) (modifiziert nach VILLAVICENCIO, E.H. ET AL. 2000).

1.2 Die Gene der Gli-Familie

Als erstes Vertebraten *Gli*-Gen wurde *GLI* (heute *GLI1*) als amplifiziertes Onkogen in verschiedenen humanen Tumoren entdeckt. Dieses verstärkte Auftreten in Gliomen war ausschlaggebend für die Namensgebung dieses ersten Vertreters der Familie (KINZLER, K.W., ET AL. 1988; ROBERTS, W.M., ET AL. 1989) und bildete zusammen mit der charakteristischen Sequenzbeschaffenheit die Grundlage zur Identifizierung und Isolierung der verwandten Gene *GLI2* und *GLI3* aus humanem Material (RUPPERT, J.M., ET AL. 1988). Alle drei Vertebraten Gli-Proteine Gli1, Gli2 und Gli3 bilden eine Familie nahverwandter Proteine, die für Zink-Finger Proteine vom (C₂H₂)-Typ mit fünf Wiederholungen des Zink-Finger-Motivs kodieren, die zuerst in *Xenopus* in Form des Transkriptionsfaktors IIIA (TFIIIA) beschrieben worden sind (BROWN, R.S. ET AL. 1985; MILLER, J. ET AL. 1985). Weiterhin zeigen alle drei Gli-Proteine im Bereich der Zink-Finger untereinander (93%) und zu Ci (86%) und dem *C. elegans* Sex-determinierenden-Protein Tra-1 eine hohe Homologie (KINZLER, K.W. ET AL. 1988; RUPPERT, J.M. ET AL. 1990; ZARKOWER, D. UND HODGKIN, J. 1992). Außerhalb der Zink-Finger sind weitere Domänen mit begrenzter Homologie zwischen den einzelnen Gli-Proteinen und auch zwischen Gli und Ci (besonders die PKA-Phosphorylierungsstellen in Gli2 und Gli3) vorhanden. Funktionelle Studien nach der Isolation der drei Vertebraten *Gli*-Gene zeigten, daß die von ihnen kodierten Proteine die gleiche DNA-Bindungsspezifität zu einer kanonischen Nonamer-Sequenz (5'-GACCACCCA-3') aufweisen (KINZLER, K.W. UND VOGELSTEIN, B. 1990; VORTKAMP, A. ET AL. 1995). Aufgrund dieser Bindungseigenschaft konnte die Kokristallstruktur des Gli-Zink-Finger/DNA-Komplexes aufgelöst werden. Die Kristallstruktur zeigt, daß die Zink-Finger 2 bis 5 in die große Grube des DNA-Moleküls passen und eine volle helikale Windung der DNA einhüllen. Für den Zink-Finger 1 konnte keine Wechselwirkung mit der DNA, aber eine Protein-Protein-Wechselwirkung mit Zink-Finger 2 gezeigt werden. Für die Zink-Finger 4 und 5 wurde auf der Grundlage der Kristallstruktur die Erkennungsfunktion der kanonischen Nonamer-Sequenz angenommen (PAVLETICH, N.P. UND PABO, C.O. 1993). Die aus der Kristallstruktur abgeleiteten Daten verdeutlichten die DNA-Bindung der Gli-Proteine und unterstützen ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren.

1.2.1 Funktionen der Gli-Proteine während der Entwicklung und im Hh-Signalweg

Die Gli-Proteine haben wichtige Aufgaben während der Entwicklung. Sie sind an der Determinierung von Zellen, der Proliferation verschiedener Zelltypen und der

Musterbildung in einer Vielzahl von Organen beteiligt. Ihre Bedeutung und die Notwendigkeit der exakten zeitlichen wie räumlichen Regulation ihrer Aktivität in einem multizellulären System wird daran deutlich, daß ihre Fehlfunktionen sowohl mit mehreren schweren sporadischen (einschließlich Krebs) als auch vererbten Erkrankungen verbunden sind (Übersicht bei MATISE, M.P. UND JOYNER, A.L. 1999; RUIZ I ALTABA, A. 1999; VILLAVICENCIO, E.H. ET AL. 2000).

Durch die Untersuchung der Gli-Proteinfunktion konnte gezeigt werden, daß die Gli-Bindungssequenzen notwendig und ausreichend sind, um *in vitro* die Transkription eines Reportergenkonstruktes zu aktivieren und die Transkription eines *PTCH1*- bzw. *Gli1*-Reportergenkonstruktes durch Gli3 zu induzieren. Außerdem führt die ektopische Expression von Gli1 zu einer Induktion des Zielgens *HNF-3 β* in der Grundplatte transgener Mäuse und im Frosch (LEE, J. ET AL. 1997; SASAKI, H. ET AL 1997; DAI, P. ET AL. 1999; SHIN, S.H. ET AL. 1999). Die Vermittlung der transaktivierenden Wirkung scheint bei Gli1 eine VP16-ähnliche Proteindomäne zu übernehmen, wohingegen Gli3 und wahrscheinlich auch Gli2 dieses über den Koaktivator CBP erreichen, da eine Bindung von CBP an Gli3, jedoch nicht an Gli1, gezeigt werden konnte (AKIMARU, H. ET AL. 1997; YOON, J.W. ET AL. 1998; DAI, P. ET AL. 1999). Ähnlich wie bei Ci scheint auch für die Funktion und die Regulation der Aktivität der Gli-Proteine die subzelluläre Lokalisation von Bedeutung zu sein. Die *in vitro*-Untersuchungen mit Epitop-markierten Gli-Proteinen konnten zeigen, daß diese parallel zu den Befunden in *Drosophila* bevorzugt im Zytoplasma aufzufinden sind (LEE, J. ET AL. 1997; RUIZ I ALTABA, A. 1999; SHIN, S.H. ET AL. 1999). Neben der subzellulären Lokalisation ist für die Ci-Funktion auch die gebildete Proteinform (Ci-155/Ci-75) von zentraler Bedeutung. Die Prozessierung der Vertebraten Gli-Proteine ist wesentlich kontroverser und unklarer als die beobachtete Prozessierung von Ci. So konnte in Mausembryoextrakten eine Prozessierung in verschieden große Proteine für Gli3 gezeigt werden jedoch nicht für Gli1 (DAI, P. ET AL. 1999). Im Zellkultursystem konnte zusätzlich zur Prozessierung von Gli3 die Prozessierung von Gli2 gezeigt werden und für Gli1 eine Prozessierung im Frosch, jedoch nicht in der Maus (DAI, P. ET AL. 1999; RUIZ I ALTABA, A. 1999). Weiterhin konnten C-terminal verkürzte Formen aller drei Gli-Proteine vergleichbar zu Ci-75 sowohl im Zytoplasma als auch verstärkt im Nukleus von kultivierten Zellen und transfizierten Froschembryonen gefunden werden (Lee, J. et al. 1997; Dai, P. et al. 1999; Ruiz i Altaba, A. 1999; Shin, S.H. et al. 1999). Als möglicher Regulator dieser Prozessierung in der einzelnen Zelle scheint ebenfalls PKA von großer Bedeutung zu sein (Dai, P. et al 1999), denn es konnte für Gli3 neben dem Auftreten des Gesamtproteins (Gli3-190) eine PKA-abhängige Prozessierung in ein Gli3-

Protein mit 83kDa *in vitro* gezeigt werden. Neben dieser Prozessierung vermittelt PKA auch eine direkte Phosphorylierung von Gli3-190 *in vitro*. Notwendig für die Phosphorylierung und die sich anschließende Prozessierung sind sechs Bereiche C-terminal der Zink-Finger Region, die die erforderliche Konsensus-Sequenz für eine PKA-Phosphorylierungsstelle aufweisen. Durch Untersuchungen an Gliedmaßenknospen der Maus und des Huhns konnte gezeigt werden, daß ebenfalls *in vivo* eine Prozessierung von Gli3 stattfindet und daß ein anterior-posteriorer Gradient von Gli3-Genprodukten (mRNA und Protein) aufgebaut wird. Es zeigt sich, daß die Menge an Gli3-190 relativ konstant entlang der anterior-posterioren Achse der Extremität ist. Die vorherrschende Proteinform ist jedoch Gli3-83, das in seiner Menge von anterior nach posterior dramatisch abnimmt. Es wird somit ein anterior-posteriorer Gradient aufgebaut, der durch verringerte Prozessierung von Gli3-190 und als Konsequenz einer Abnahme der Menge an Gli3-83 zustande kommt. Zusätzlich zeigt sich in diesem *in vivo*-System eine direkte Beeinflussung der Transkription und der Gli3-Prozessierung durch Shh, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der in den Gliedmaßen beobachtete Gradient von Gli3-83 durch Shh-Signale beeinflußt und gegebenenfalls aufgebaut wird (WANG, B. ET AL. 2000).

Entsprechend der in *Drosophila* gefundenen Korrelation zwischen Proteinprozessierung und funktional unterschiedlichen Formen von Ci, wurden alle drei Vertebraten Gli-Proteine auf mögliche ähnliche Beziehungen hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß C-terminal der Zink-Finger Region verkürztes Gli2- und besonders drastisch Gli3-Protein die Repression der Reportergenexpression im Zellkultursystem sowie eine Repression von Shh-Zielgenen *in vivo* hervorrufen (DAI, P. ET AL. 1999; RUIZ I ALTABA, A. 1999; SHIN, S.H. ET AL. 1999; WANG, B. ET AL. 2000). Das C-terminal verkürzte Gli3-Repressorprotein aber nicht das Gesamtprotein kann außerdem mit Smad-Proteinen interagieren, die die intrazellulären Übermittler von TGF β -Signalen sind. Hierdurch kann möglicherweise eine Verbindung zwischen dem Hh- und dem TGF β -Signalweg hergestellt werden (LIU, F. ET AL. 1998). Im Gegensatz zu Gli2 und Gli3 scheint Gli1 keine derartige oder eine nur sehr schwache N-terminale Repressordomäne zu besitzen und das Gesamtprotein scheint bevorzugt als Aktivator zu wirken. Als vollständige Proteine können ebenfalls Gli2 und sehr stark abgeschwächt auch Gli3 aktivierend auf die Reportergenexpression im Zellkultursystem wirken. So konnte *in vitro* eine transaktivierende Fähigkeit von Gli3 auf ein Gli1 Promoterfragment gefunden werden (DAI, P. ET AL. 1999; RUIZ I ALTABA, A. 1999; SHIN, S.H. ET AL. 1999). Einen wesentlich stärkeren Effekt zeigt Gli3 jedoch in der Repression der durch Gli1 *in vitro* erzeugten Stimulation der Reportergenexpression (SHIN, S.H. ET AL. 1999; SASAKI, H. ET AL. 1999;

WANG, B. ET AL. 2000). Für Gli2 konnte gezeigt werden, daß es die Differenzierung von Motoneuronen im Froschembryo induzieren kann (RUIZ I ALTABA, A. 1998). Außerdem müssen Gli2 und Gli3 zusätzliche regulatorische Elemente im N-Terminus proximal der Zink-Finger Domäne besitzen, da eine Entfernung des N-Terminus aus beiden Proteinen starke *in vitro* und *in vivo* Aktivatoren macht (SASAKI, H. ET AL. 1999).

Die Schwierigkeit der Dateninterpretation über die Prozessierung von Gli-Proteinen und die Korrelation der Funktion einzelner entstandener Proteine mit aktivierenden oder reprimierenden Aktivitäten ist, daß sie unter unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen (verschiedene Zelllinien, verschiedene Organismen) beobachtet worden sind. Hierbei sind besonders in den *in vitro*-Systemen bestimmte Unschärfen der Ergebnisse nicht auszuschließen und bei den verschiedenen Organismen läßt sich nicht ausschließen, daß die einzelnen *Gli*-Gene in den verschiedenen Spezies leicht unterschiedliche Funktionen entwickelt haben, die die Folge evolutionärer Selektion sind.

Die Expressionsanalyse der verschiedenen *Gli*-Gene zeigt, daß *Gli1* zusammen mit *Ptc* in proliferierenden Zellen in unmittelbarer Nähe zu Shh synthetisierenden und sekretierenden Zellen exprimiert wird während *Gli2* und *Gli3* breiter und in einer größeren Entfernung zu Shh zu finden sind. Hierbei zeigt *Gli3* die am weitesten von Shh entfernte Expression (HUI, C.C. ET AL. 1994; STONE, D.M. ET AL. 1996; MARIGO, V. ET AL. 1996; LEE, J. ET AL. 1997; MARINE, J.-C. ET AL. 1997; PLATT, K.A. ET AL. 1997; SASAKI, H. ET AL. 1997; BORYCKI, A.G. ET AL. 1998). Das heißt im Einzelnen, daß z.B. die ventral begrenzte Expression von *Gli1* im ZNS eine Funktion im Shh-Signalweg andeutet, die somit von entscheidender Wichtigkeit für die Differenzierung des ventralen ZNS ist. Unterstützt wird dies durch die Aktivierung von *Gli1* durch Shh, die Induktion der *Gli1* und *Ptc* Expression durch die ektopische Expression einer dominant-negativen PKA-Form im ZNS, durch die Fähigkeit von ektopisch exprimiertem *Gli1* eine Induktion von Shh-Zielgenen (*HNF-3 β*) im Neuralrohr hervorzurufen und der Fähigkeit, die Differenzierung von ventralen Zelltypen zu induzieren. Diese Fähigkeit konnte weder für *Gli2* noch für *Gli3* gezeigt werden (EPSTEIN, D.J. ET AL. 1996; HAMMERSCHMIDT, M. ET AL. 1996; HYNES, M. ET AL. 1997; LEE, J. ET AL. 1997). Trotz seiner induzierenden Wirkung auf Shh-Zielgene zeigen Mäuse, die homozygot sind für eine *Gli1*-Mutation, die die Zink-Finger Region aus dem Protein entfernt, keinerlei phänotypische Veränderungen, so daß davon ausgegangen werden muß, daß entweder die DNA-Bindung von *Gli1* nicht für die Aktivierung von Shh-Zielgenen notwendig ist, oder daß *Gli1* für die Übermittlung des Shh-Signals während der Entwicklung nicht benötigt wird (MATISE, M.P. ET AL. 1998; PARK, H. ET AL. 2000). In Mäusen, die eine vergleichbare Mutation in *Gli2* tragen, lassen sich hingegen eine Vielzahl

von Störungen erkennen, die auf eine Funktion als Vermittler des Shh-Signals schließen lassen. Diese treten sowohl im ZNS (DING, Q. ET AL. 1998; MATISE, M.P. ET AL. 1998) als auch in der Entwicklung von Wirbeln, der Lunge und den Knochen auf (MO, R. ET AL. 1997; MOTOYAMA, J. ET AL. 1998B). Die Untersuchung der Doppelmutanten (*Gli1*^{-/-};*Gli2*^{+/-} und *Gli1*^{-/-};*Gli2*^{-/-}) zeigt, daß diese einen progressiv schwereren Phänotyp als *Gli1*^{-/-} Tiere aufweisen. Die beobachteten Lungendefekte und Störungen der ZNS-Entwicklung sind jedoch insgesamt milder als die in *Gli2*- oder *Shh*-Mutanten beobachteten. Es findet z.B. die Induktion der Motoneurone während der Neuralrohrdifferenzierung statt und die Musterbildung und Zähligkeit der Gliedmaßen ist ebenfalls weitestgehend normal. Die einzige beobachtete Abnormalität der Gliedmaßen ist das Auftreten eines postaxialen Gewebearhangs mit geringer Häufigkeit in den doppelt homozygoten Tieren (MATISE, M.P. ET AL. 1998; PARK, H. ET AL. 2000). Es zeigt sich also, daß die DNA-bindende Domäne von Gli1 nicht notwendig ist, um das Shh-Signal in der Maus zu übertragen. Basierend auf den Untersuchungen der Doppelmutanten scheinen Gli1 und Gli2 jedoch in einigen Geweben überlappende Funktionen zu haben. Hierbei ist Gli2 primär für die Induktion von Shh-empfindlichen Zellen verantwortlich und Gli1 nur in wenigen Geweben in Kombination mit Gli2 für die Differenzierung notwendig.

Für *Gli3* sind eine Vielzahl von Mutationen und damit verbunden Entwicklungsstörungen im Menschen und in der Maus beschrieben (VORTKAMP, A. ET AL. 1992; HUI, C.C. UND JOYNER, A.L. 1993; BIESECKER, L. 1997; KALFF-SUSKE, M. 1999; THEIL T. ET AL. 1999B). Die Analyse der Mutationen in der Maus und besonders die phänotypische und molekulare Analyse der *Xt^l*-Mausmutante (siehe 1.2.2) deuten eine vorherrschende Funktion von Gli3 als Repressor der Shh-Expression bzw. –Funktion im sich entwickelnden ZNS und in den sich entwickelnden Gliedmaßen an und steht somit im Einklang mit den *in vitro* erhaltenen Daten. Gleichzeitig unterliegt Gli3 sowohl im ventralen ZNS, als auch in den Gliedmaßen einer negativen Regulation durch Shh (MARIGO, V. ET AL 1996; BÜSCHER, D. ET AL 1997; RUIZ I ALTABA, A. 1998; LITINGTUNG, Y. UND CHIANG, C. 2000).

Die beobachteten relativ milden Phänotypen in den verschiedenen *Gli*-mutanten Mäusen im Vergleich zu ihrer weit verbreiteten räumlichen und zeitlichen Expression im sich entwickelnden Embryo lassen neben den verschiedenen eigenständigen Funktionen auch auf eine funktionelle Redundanz unter den *Gli*-Genen schließen. Deutlich wird dies bei dem verstärkten Skelett-Phänotyp in *Gli2*^{+/-};*Gli3*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den beiden einzelnen Mutanten (MO, R. ET AL 1997) und der veränderten Ausprägung des Lungenphänotyps in *Gli1/2*-Doppelmutanten verglichen mit den Einzelmutanten (PARK, H. ET AL. 2000).

Zusammenfassend kann jedoch davon ausgegangen werden, daß die *Gli1* Genfunktion für die normale Mausentwicklung entbehrlich ist (DING, Q. ET AL. 1998; MATISE, M.P. ET AL. 1998; PARK, H. ET AL. 2000) und daß trotz der Fähigkeit von ektopisch exprimiertem *Gli1* verschiedene Aspekte von ektopisch exprimiertem *Shh* zu kopieren (HYNES, M. ET AL. 1997; LEE, J. ET AL. 1997) und der immer vorzufindenden Assoziation von *Gli1* Expression und Aktivität des Shh-Signalweges, einschließlich pathologischer Umstände (DAHMANE, N. ET AL. 1997), *Gli1* nicht notwendig für die Übermittlung des Hh-Signals zu sein scheint. Die Phänotypen, die mit dem Verlust von *Gli2*- bzw. *Gli3*-Funktion verbunden sind, betreffen hingegen viele der Strukturen, die auch durch eine gezielte *Shh*-Mutation betroffen sind, so daß *Gli2* und besonders *Gli3* (siehe 1.2.3) für die normale Entwicklung von entscheidender Bedeutung sind (CHIANG, C. ET AL. 1996; MO, R. ET AL. 1997; DING, Q. ET AL. 1998; HARDCASTLE, Z. ET AL. 1998; LITINGTUNG, Y. ET AL. 1998; MATISE, M.P. ET AL. 1998; MOTOYAMA, J. ET AL. 1998).

1.2.2 Funktionen der Gli-Proteine außerhalb des Hh-Signalweges

In neuerer Zeit ergaben sich für die Gene der *Gli*-Familie weitere entwicklungsbiologisch wichtige Funktionen in Signalwegen, die unabhängig von Hedgehog sind.

Gli-Funktion im Fgf-Signalweg

Die Musterbildung entlang der antero-posterioren Achse während der frühen Entwicklung des Froschembryos trägt zur Spezifizierung des ventro-posterioren embryonalen Mesoderms bei. Diese posteriore Spezifikation wird im Wesentlichen durch FGF- und Homeodomänen-Proteine vermittelt.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß Gli-Proteine wichtige Mediatoren für die Übermittlung der Fgf-Signale während der Musterbildung entlang der antero-posterioren Achse sind, um posteriore Zellschicksale zu determinieren. Die Gli-Proteine, vorallem *Gli2*, aber auch mit einer zeitlichen Verzögerung *Gli3*, jedoch nicht *Gli1*, spielen eine wichtige Rolle in dem FGF-brachyury-Regelkreis. Sie führen zu einer direkten Aktivierung von *brachyury*, das sowohl notwendig, als auch ausreichend ist für die frühe Mesodermentwicklung (SMITH, J.C. ET AL. 1991; CUNLIFFE, V. UND SMITH, J.C. 1992), und unterliegen gleichzeitig der Kontrolle durch induzierende FGF-Signale. Weiterhin können sie ventro-posteriore Eigenschaften vermitteln, indem sie die Expression von *Xhox3* (*Evx1*), das posteriore Identität verleiht (RUIZ I ALTABA, A. UND MELTON, D.A. 1989A,B; RUIZ I ALTABA, A. ET AL. 1991), induzieren (BREWSTER, R. ET AL. 2000).

Gli-Funktion im Wnt-Signalweg

Wnt-Proteine bzw. die von ihnen aktivierten Signalwege sind ähnlich wie Mitglieder der Fgf-Familie an der Entwicklung ventraler und posteriorer Strukturen im frühen Froschembryo beteiligt. Ferner können Wnt-Funktionen mit der posteriore Identität verleihenden Aktivität von *Xhox3* kooperieren. Aufgrund dieser Funktionen und ihrer zeitlichen und räumlichen Koexpression wurde vermutet, daß *Wnt*-Gene Ziel und Mediatoren von *Gli*-Genfunktion während der Spezifizierung bzw. Entwicklung des ventro-posterioren Mesoderms während der frühen Froschentwicklung sind.

Kürzlich konnte tatsächlich gezeigt werden, daß Gli-Proteine die Expression verschiedener *Wnt*-Gene, die an der Entwicklung des ventro-posterioren Mesoderms beteiligt sind, regulieren. Während der Morphogenese ventro-posteriorer Strukturen im Froschembryo kommt es zu einer direkten Aktivierung von *Wnt8* und wahrscheinlich auch *Wnt11* durch Gli2 und Gli3. Durch diese Aktivierung der beiden *Wnt*-Gene wird sowohl der β -catenin-Signalweg, als auch der Ca^{2+} /CamKII-Signalweg stimuliert (KÜHL, M. ET AL. 2000; TADA, M. UND SMITH, J.C. 2000). Durch diese gemeinsame Aktivierung kann es zu einer Koordinierung der beiden Signalwege kommen, die jeder für sich alleine nicht ausreichend sind, um die ventro-posteriore Entwicklung zu unterstützen. Weiterhin kommt es durch Gli2 und Gli3 zu einer indirekten Aktivierung von *Wnt5A*, 7B, 7C und 8B in „Animal Cap“-Analysen, so daß es wahrscheinlich ist, daß noch weitere *Wnt*-Gene als Mediatoren an der durch Gli-Proteine induzierten posterioren Entwicklung des Froschembryos beteiligt sind. Ferner konnte für Gli1 in diesen Analysen gezeigt werden, daß es die Expression von *Wnt5A*, 7B, 7C (indirekt) und 8 (direkt) induziert oder wenigstens verstärkt (MULLOR, J.L. ET AL. 2001).

In einem anderen experimentellen Ansatz konnte weiterhin gezeigt werden, daß *Gli2* und *Gli3* durch Wnt-Signale vom Oberflächenektoderm und Neuralrohr reguliert werden. Diese durch *Wnt1* und *Wnt4* ausgelöste und durch β -catenin vermittelte Regulation der *Gli*-Genexpression hat sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen. So zeigten die Analysen im Wachtelembryo, daß Oberflächenektoderm- und Neuralrohr-Wnt-Signale die Expression von *Gli3* im segmentierten Plattenmesoderm unterdrücken. Während der Somitenbildung verändert sich dieser negative Einfluß auf die Expression allerdings in einen positiven und wirkt aktivierend auf die Expression von *Gli2* und *Gli3* (BORYCKI, A.-G., ET AL. 2000).

Zusammenfassend kann vermutet werden, daß durch eine Beteiligung der Gli-Proteine an verschiedenen Signalwegen (Hh, Fgf und Wnt), die alle drei für die Embryonal-

entwicklung von Vertebraten von elementarer Wichtigkeit sind, entweder ein funktionstüchtiges System von Signalmediatoren während der Evolution auf mehrere Wege übertragen worden ist, oder daß es durch die Beteiligung der Gli-Proteine als Ziele und Mediatoren der einzelnen Signalwege zu einer fein abgestimmten synergistischen wie antagonistischen Interaktion der einzelnen Wege während der Entwicklung und auch im späteren Lebenszyklus des Organismus kommen kann. Das heißt, daß die vorrangig Gli-Aktivität induzierenden Signalwege (Hh und Fgf) mit einer entsprechenden Wnt-Proteinfunktion und der damit verbundenen biologischen Konsequenz verknüpft werden können. Weiterführende Untersuchungen können hier wichtige und interessante Querverbindungen im genetischen Netzwerk der Entwicklung aufzeigen, die zum weiteren Verständnis des koordinierten Ablaufes der Embryonalentwicklung der Vertebraten beitragen können.

1.2.3 *Gli3* Mutationen in der Maus

In der Maus sind zur Zeit vier allelische phänotypisch ähnliche Mutanten Xt^H , Xt^J , *add* (*anterior digit pattern deformity*) und *Pdn* (*Polydactyly Nagoya*) beschrieben, die alle Mutationen im *Gli3*-Gen (Chr. 13; 8.0 cM) tragen. Die erste dieser Mutanten ist die spontan aufgetretene *Extra-toes* (*Xt*)-Mutante, die später zusammen mit einer induzierten als Xt^H bezeichnet wurde (JOHNSON, D. R. 1969). Die heterozygoten $Xt/+$ Tiere sind durch zusätzliche Zehen an der präaxialen (anterioren) Seite beider Hinterpfoten und entsprechende leichte Veränderungen an den Vorderpfoten gekennzeichnet. Die Neugeborenen sind bei der Geburt etwas schwerer und größer als Wildtyp-Geschwister und sind bei sonst äußerlich normaler Erscheinung voll lebensfähig. Die homozygoten *Xt*-Mäuse zeigen eine deutliche Verstärkung der Störungen, sind ab Tag (E) 12,5 der Embryonalentwicklung deutlich von nicht-homozygoten zu unterscheiden und sterben *in utero*, während oder kurz nach der Geburt. Sie fallen zunächst durch die stark veränderte, gekrümmte, C-förmige Körperhaltung auf und sind aufgrund einer Vielzahl schwerer Fehlbildungen nicht lebensfähig. Hierzu zählen vorallem Ödeme, Abnormalitäten der inneren Organe, Hemimelie und andere schwerwiegende Veränderungen des Skeletts, gravierende Mißbildungen des Gehirns und des umgebenden Schädels (auch Exenzephalie), des zentralen Nervensystems sowie der Sinnesorgane und paddelartig aussehende (Vorder- und Hinter-) Pfoten mit bis zu acht Zehen (JOHNSON, D.R. 1967). Durch molekulare Analysen konnte für die Xt^H -Mutante eine Deletion der 5'-Region des *Gli3*-Gens von mindestens 80 Kilobasenpaaren (kb) Ausdehnung gezeigt werden (VORTKAMP, A. ET AL. 1992). Außerdem konnte eine damit verbundene Reduktion der

Expression des *Gli3*-Gens in den hetero- und homozygoten Tieren nachgewiesen werden (SCHIMMANG, T. ET AL. 1992). Die ebenfalls semi-dominante *Xt^J*-Mausmutante entstand spontan im „Jackson Laboratory“ und zeigt einen heterozygoten Phänotyp, der dem der ursprünglichen *Xt*-Mutante sehr ähnlich ist. Die homozygoten Tiere sterben innerhalb von zwei Tagen nach der Geburt oder bereits *in utero*. Sie zeigen Poly- und Syndaktylie aller Pfoten mit einer prä- und postaxialen Erweiterung der Pfoten mit bis zu 8 Zehen. Neben dem Auftreten von Ödemen, einer gestörten Entwicklung des Gesichtsschädels und der Sinnesorgane kann ein verzögertes Zuwachsen des Neuralrohres, das Auftreten von Exenzephalie und eine Störung der Gehirnentwicklung beobachtet werden. Hierbei wird die Grenze zwischen Diencephalon und Telencephalon nicht ausgebildet und es kommt zu einer Größenreduktion des Neocortex. Außerdem sind die Entwicklung von Hippocampus und Choroid Plexus gestört (THEIL, T. ET AL. 1999A). Die molekularen Analysen der *Xt^J*-Mutante zeigten ebenfalls eine Deletion mit unbekannter Ausdehnung, die sich jedoch über die 3'-Region des *Gli3*-Gens (HUI, C. C., UND JOYNER, A. L. 1993) erstreckt. Detailliertere Untersuchungen konnten zeigen, daß es sich um eine intergenische Deletion handelt. Durch die Deletion kommt es zur Bildung einer Fusions-mRNA, die bis zur ersten Hälfte des ersten Zink-Fingers (1670 bp) für *Gli3* kodiert und danach durch 293 bp eines bisher unbekannten Gens verlängert wird (BÜSCHER, D. ET AL. 1998). Die genaue Untersuchung des Expressionsmusters von *Gli3* ergab weiterhin, daß eine Expression vom Beginn der Gastrulation an hauptsächlich in weiten Teilen des Ektoderms und Mesoderms aber nicht im Endoderm detektiert werden kann (SCHIMMANG, T. ET AL. 1992; WALTERHOUSE, D. ET AL. 1993; HUI, C. C. ET AL. 1994). Weitere *In situ*-Hybridisierungen von Mausembryonen ergaben, daß die Regionen stärkster *Gli3*-Expression mit den für die *Xt*-Mausmutante beschriebenen Störungen in meso- und ektodermalen Strukturen der Kopf- und Gliedmaßenregion korrelieren. Zusätzlich konnte durch die Untersuchung homozygoter *Xt^J*-Mausembryonen eine Beteiligung von *Gli3* an der Lungenmorphogenese gezeigt werden (GRINDLEY, J. C., ET AL. 1997). Die nachfolgenden molekularen Analysen des Gliedmaßenphänotyps konnten in den sich entwickelnden Gliedmaßen der *Xt*-Mausmutante zeigen, daß sich im Gegensatz zum Wildtyp durch den Verlust der reprimierenden *Gli3*-Aktivität eine ektopische *Shh*-Domäne im anterioren Bereich der Gliedmaßen ausbildet (BÜSCHER, D. ET AL. 1997). Diese anteriore *Shh*-Domäne scheint eine zweite ZPA zu repräsentieren, die somit zusätzlich zur eigentlichen ZPA im posterioren Bereich der Gliedmaßen als Signalzentrum während der antero-posterioren Musterbildung dient und im Zusammenspiel mit den anderen an der Gliedmaßenentwicklung beteiligten Faktoren zur Ausbildung des polydaktylen Phänotyps führt

(MASUYA, H. ET AL. 1995; MASUYA, H. ET AL. 1997; BÜSCHER, D., ET AL. 1997). Auf dieser Grundlage, dem Aufkommen einer zweiten *Shh*-exprimierenden Domäne nach Verringerung oder vollständigem Ausfall der *Gli3*-Expression, ist es wahrscheinlich, daß *Gli3* einen negativen Einfluß auf *Shh* hat und während der normalen Gliedmaßenentwicklung die Ausbildung einer zweiten ZPA verhindert (BÜSCHER, D., ET AL. 1997). Zusammen mit den Erkenntnissen aus anderen polydaktylen Mausmutanten und den Überexpressionsstudien von *Shh* im Huhn (MARIGO, V. ET AL. 1996) kann hieraus gefolgert werden, daß *Gli3* die Expression von *Shh* im anterioren Bereich der sich entwickelnden Gliedmaßen unterdrückt und hierbei einer negativen Regulation durch *Shh* unterliegt. Die rezessive *add*-Mutante (POHL, T.M. ET AL. 1990) entstand durch Insertionsmutagenese. Sie unterscheidet sich in ihrem Phänotyp deutlich von den anderen allelischen Mausmutanten, das heißt, daß nur die homozygoten Tiere Veränderungen des anterioren Teils der Vorderpfoten zeigen. Auffällig ist hier besonders die drastische Veränderung in der Länge und Morphologie des in der Maus nur rudimentär angelegten Daumens in Verbindung mit der Ausbildung einer Gewebesyndaktylie zwischen dem Daumen und dem zweiten Zeh. Die molekularen Untersuchungen der *add*-Mutante zeigten die Integration des Transgens im 5'-Bereich des *Gli3*-Gens. Aufgrund der Untersuchung der Integrationsstelle wurde eine Insertion des Transgens in der unmittelbaren Nähe oder direkt im Promotor des *Gli3*-Gens vermutet, die eine Verringerung der Genexpression verursacht (POHL, T.M. ET AL. 1990; SCHIMMANG, T. ET AL. 1993; VAN DER HOEVEN, F. ET AL. 1993). Die *Pdn*-Mausmutante ist eine spontan aufgetretene semi-dominante Mutante mit Störungen der Gliedmaßen- und Kopfentwicklung. Die homozygoten Tieren sterben innerhalb von zwei Tagen nach der Geburt und zeigen eine schwach ausgebildete präaxiale Polydaktylie der Vorder- und Hinterpfoten, Veränderungen des Skeletts, eine Deformation des Sternums und Hemimelie. Aufgrund der Störungen der Gehirnentwicklung kann es zu einer Abwesenheit des Riechhirns sowie der Ausbildung von Exencephalie und Hydrozephalie in den homozygoten Tieren kommen (HAYASAKA, I. ET AL. 1980; NARUSE, I. UND KAMEYAMA, Y. 1982; SCHIMMANG, T. ET AL. 1994). Für die *Pdn*-Mutante wurde ursprünglich eine das *Gli3*-Protein inaktivierende Punktmutation als Ursache der beobachteten Veränderungen angenommen (SCHIMMANG, T. ET AL. 1994). Die nachfolgenden Analysen konnten diese Annahme allerdings nicht bestätigen, sondern zeigten die Insertion eines Retrotransposons im 5'-Bereich des *Gli3*-Gens, die zur Bildung verschiedener Transkripte führt, die für verkürzte *Gli3*-Proteine kodieren (THIEN, H. UND RÜTHER, U. 1999).

1.2.4 Die Beteiligung von *GLI3* an menschlichen Fehlbildungserkrankungen

GLI3 (MIM 165240) liegt auf Chromosom 7p13, umfaßt 200 bis 250 kb genomischer Sequenz (VORTKAMP, A. ET AL. 1994), ist als 8,5-kb mRNA exprimiert und kodiert über 14 Exons verteilt (KANG, S. ET AL. 1997) für ein 1596 Aminosäuren großes Polypeptid mit einem relativen Molekulargewicht von 190 kDa. Im Gegensatz zu *GLI1* (MIM 165220), das durch seine Assoziation mit Gliomen identifiziert und isoliert worden ist, konnte eine Verbindung von *GLI3* weder mit Gliomen noch mit anderen Formen von Neoplasien gezeigt werden (VOGELSTEIN, B. 1994). Es ist jedoch offensichtlich, daß *GLI3* für die Embryonalentwicklung von großer Bedeutung ist, da Mutationen in *GLI3* für verschiedene Fehlbildungserkrankungen verantwortlich gemacht werden können (Übersicht bei BIESECKER, L. 1997; THEIL, T. ET AL. 1999B).

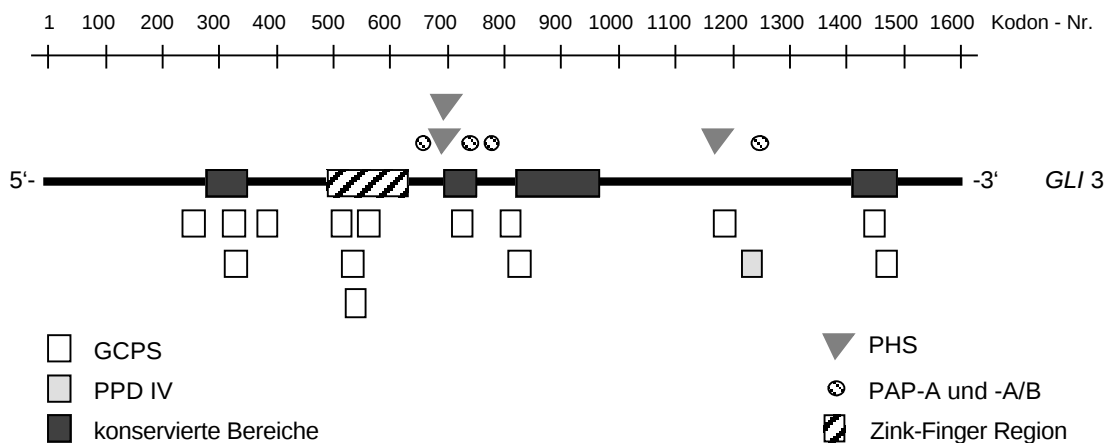


Abbildung 1.3: *GLI3*-Mutationen in GCPS, PPD IV, PHS, PAP-A und PAP-A/B. Der kodierende Bereich der *GLI3*-cDNA ist schematisch dargestellt. Die unterlegten Boxen repräsentieren die konservierten Bereiche von *GLI3*. Die relative Position der in den einzelnen Fehlbildungserkrankungen identifizierten *GLI3*-Mutation ist durch ein Symbol dargestellt.

Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom; GCPS (MIM175700)

Erstmalig wurde 1928 eine Familie mit veränderter Schädelform und aufgespaltenen Phalangen der Daumen und des ersten Zehes in Verbindung mit Syndaktylie von GREIG, D.M. beschrieben. Es konnte gezeigt werden, daß es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung handelt, bei der außerdem noch postaxiale Polydaktylie der Hände, Störungen der Hüftentwicklung und ein verstärktes Auswachsen des vorderen Schädels auftreten können. Weitere Untersuchungen ergaben, daß Deletionen und Translokationen im chromosomalen Bereich 7p15-p21 kritisch für die Entwicklung von GCPS sind. In Patienten ohne offensichtliche chromosomale Abnormalitäten konnte das GCPS-kritische Intervall weiter auf die Region 7p13 eingengt werden. Nach der Positionierung von *GLI3*

an 7p13 konnte gezeigt werden, dass zwei der drei mit GCPS verbundenen Translokationen zu einer Unterbrechung des *GLI3*-Gens innerhalb des ersten Drittels der kodierenden Sequenz führen und die dritte unterhalb des *GLI3*-Gens auf dem Chromosom 7 liegt (VORTKAMP, A. ET AL. 1991). Weitere Unterstützung für die Annahme, dass ein Verlust der *GLI3*-Funktion zu GCPS führt, kam von vergleichenden morphologischen (Art der Polydaktylie) und genetischen Analysen (chromosomale Lokalisation), die die Homologie zwischen GCPS und der *Xt* (*Extra toes*)-Mausmutante aufzeigten (WINTER, R.M. UND HUSON, S.M. 1988; HUI, C.C., UND JOYNER, A.L. 1993). Unterstützt wurde diese Annahme von den weiteren Analysen, die zeigten, dass die *Xt^H*-Mausmutante eine Deletion in der 5'-Region des *Gli3*-Gens aufweist (VORTKAMP, A. ET AL. 1992) und dass die Expression von *Gli3* in dieser Mutante verringert ist (SCHIMMANG, T. ET AL. 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Expression von *Gli3* in der *Xt^L*-Mausmutante durch eine Deletion der 3'-Region des *Gli3*-Gens hervorgerufen wird und dass die in der Mausmutante und in den GCPS-Patienten betroffenen Strukturen mit den Gebieten der *Gli3*-Expression in der Maus korrelieren (HUI, C.C. UND JOYNER, A.L. 1993). Zusätzlich zu den Deletionen und Translokationen in GCPS-Patienten konnten schließlich als bisher nicht gekannte Mutationen auch Aminosäureaustauschmutationen (Q496X;P707S) in einer betroffenen Familie gezeigt werden, die zu einem verfrühten Abbruch der Proteinsynthese führen oder eine konservierte Aminosäure austauschen (WILD, A. ET AL. 1997). Die weiterführende *GLI3*-Mutationsanalyse in 24 GCPS-Patienten führte zur Identifikation von 15 neuen Mutationen im *GLI3*-Gen. Diese Mutationen verteilen sich über den gesamten kodierenden Bereich des *GLI3*-Gens und 9 dieser Mutationen führen zu einem vorzeitigen Abbruch des Proteins. Interessanterweise erstrecken sich zwei Drittel der Mutationen über den N-terminalen oder zentralen Bereich des *GLI3*-Proteins wohingegen nur ein Drittel im C-terminalen Bereich des Proteins zu finden sind (KALFF-SUSKE, M. ET AL. 1999).

Pallister-Hall Syndrom; PHS (MIM 146510)

Erstmals wurde an 6 Neugeborenen durch HALL, J.G. ET AL. 1980 ein neonatal letales Fehlbildungssyndrom beschrieben, das durch zentrale und postaxiale Polydaktylie, Verkürzungen der Finger/Zehen, verzögerte Mineralisierung der Extremitätenknochen, Syndaktylie, Fehlstellungen der Hüfte, Dysplasie der Nägel, imperforierten Anus, Fehlstellungen der Nase und Ohren, leichte Fehlbildungen des Gesichtsschädels, gespaltenen oder fehlenden Kehldeckel, gespaltenen Kehlkopf, gestörte Ausbildung der Lungenflügel, Dysplasie oder Agenesie der Nieren, Mikrophallus, intrauterine Wachstumsverzögerung, angeborene Herzdefekte, hypothalamische Hämangioblastome, die

hauptsächlich aus primitiven undifferenzierten Zellen bestehen, und die Abwesenheit der anterioren Hypophyse charakterisiert ist. Alle Fälle waren spontan aufgetreten und es konnten keine Umwelteinflüsse oder Chromosomenveränderungen als Auslöser für dieses schwere Fehlbildungssyndrom gefunden werden. Durch die weiteren Untersuchungen konnten sporadische und wenige familiäre Fälle identifiziert werden, die zeigten, daß es sich bei dem Pallister-Hall Syndrom scheinbar um eine autosomal dominant vererbte Fehlbildungserkrankung handelt, die in den meisten Fällen durch geringe Penetranz und variable Expressivität einen sehr heterogenen Phänotyp mit geringer Morbidität zeigt. Aufgrund des variablen Phänotyps, der besonders in den familiären Fällen zu beobachten ist, und dem Auftreten von Langzeitüberlebenden unter diesen, wurden schließlich die Minimalkriterien für die Zugehörigkeit der Patienten zum Pallister-Hall-Syndrom definiert. Demnach sind sowohl hypothalamische Hamartome als auch die zentrale Polydaktylie die diagnostischen Hauptkriterien. Ferner muß eine autosomal-dominate Vererbung dieser Merkmale in den Familien stattfinden (BIESECKER, L. ET AL. 1996). Durch eine genomweite Suche mit polymorphen Markersequenzen konnte in 4 betroffenen Familien mit 32 erkrankten von insgesamt 68 Familienmitgliedern eine Verbindung mit Chromosom 7 gezeigt werden. Die Feinanalyse zeigte eine Verknüpfung des Pallister-Hall Syndromes mit der Region zwischen den Markersequenzen D7S521 und D7S678 (KANG, S. ET AL. 1996). Aufgrund dieser Analysen wurde *GLI3* als mögliches Kandidatengen für das Pallister-Hall Syndrom näher untersucht und es wurden in zwei untersuchten Familien Leserastermutationen identifiziert (1-BP DEL,2023G; 1-BP DEL,2012G), die in der Region distal des Zink-Finger Motivs liegen und zu einem vorzeitigen Proteinabbruch führen (KANG, S. ET AL. 1997). Zusätzlich zu diesen Leserastermutationen konnte eine weitere Mutation im *GLI3*-Gen identifiziert werden (GLU1147TER), die zu einem Pallister-Hall Syndrom Phänotyp führt (RADHAKRISHNA, U. ET AL. 1999).

Postaxiale Polydaktylie Typ A; PAP-A (MIM 174200)

Für die Postaxiale Polydaktylie Typ A ist das Auftreten eines vollständig ausgebildeten und funktionsfähigen sechsten Fingers oder Zehes, der dem fünften Metacarpal bzw. –tarsal oder einem zusätzlichen carpalen bzw. tarsalen Knochen entspringt, charakteristisch. Bei der Untersuchung einer fünf Generationen umfassenden indischen Familie mit 15 betroffenen Individuen konnte das Auftreten des Phänotyps mit der chromosomalen Region 7p15-q11.23 verknüpft werden (RADHAKRISHNA, U. ET AL. 1997A). Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß in diesen Patienten eine Deletion eines Nukleotids und damit verbunden eine Leserastermutation in einem Allel des *GLI3*-

Gens vorliegt, so daß ein verkürztes Protein (AA764) kodiert wird (RADHAKRISHNA, U. ET AL. 1997B).

Phänotyp	Codon	Mutation	Referenz
GCPS	236	Glu -> Term	1
	307	Deletion	1
	310	Deletion	1
	366	Insertion	1
	496	Gln -> Term	2
	515	Cys -> Gly	1
	520	Cys -> Tyr	1
	543	Glu -> Term	1
	707	Pro -> Ser	2
	792	Arg -> Term	1
	808	Ile -> Met	1
	1167	Deletion	1
	1431	Insertion	1
	1452	Deletion	1
PHS	670	Deletion	4
	674	Deletion	4
	1147	Glu ->Term	3
PAP-A	763	Deletion	5
PAP-A/B	643	Arg -> Term	3
	727	Gly -> Arg	3
	1235	Deletion	3
PPD IV	1215	Insertion	3

(1) KALFF-SUSKE, M. ET AL. 1999 (2) WILD, A. ET AL. 1997 (3) RADHAKRISHNA, U. ET AL. 1999

(4) KANG, S. ET AL. 1997 (5) RADHAKRISHNA, U. ET AL. 1997B

Tabelle 1: Zusammenfassung der in den Fehlbildungserkrankungen identifizierten *GLI3*-Mutationen.

Postaxiale Polydaktylie Typ A/B; PAP-A/B (MIM 174200)

Bei der Postaxialen Polydaktylie Typ A/B treten entweder innerhalb einer Familie oder sogar in einem betroffenen Patienten sowohl Postaxiale Polydaktylie Typ A als auch Postaxiale Polydaktylie Typ B auf. Bei der Postaxialen Polydaktylie Typ B ist der zusätzliche Finger oder Zeh nur schwach oder unvollständig ausgebildet und tritt häufig nur in Form eines Hautanhanges auf. In einer derartigen Familie mit unterschiedlich ausgeprägten Formen der Postaxialen Polydaktylie konnten zwei unterschiedliche Aminosäureaustauschmutationen (ARG643TER; GLY727ARG) in *GLI3* identifiziert werden, die zu einem vorzeitigen Abbruch des Proteins führen bzw. eine hochkonservierte Aminosäure in der ersten Postzinkfinger-Domäne des Proteins verändern (RADHAKRISHNA, U. ET AL 1999).

Präaxiale Polydaktylie Typ IV; PPD IV (MIM 174700)

Die Merkmale der Präaxialen Polydaktylie Typ IV sind präaxiale Polydaktylie und Syndaktylie. Die Hände zeigen eine nur schwach ausgeprägte Duplikation des Daumen und Syndaktylie zwischen den Fingern 3 und 4. Die Füße sind schwerer betroffen und zeigen vollständige Duplikationen des ersten und auch des zweiten Zeh und Syndaktylie zwischen allen Zehen. In einer betroffenen Familie konnte schließlich eine Insertion eines Nukleotids in das *GLI3*-Gen gezeigt werden (1-BP INS, 3647C), die zu einer Leserasterverschiebung und zu einer verfrühten Termination des Proteins (AA1246) führt (RADHAKRISHNA, U. ET AL. 1999).

1.3 Die Erzeugung und Verwendung von Tiermodellen

Ein Ziel der modernen Entwicklungsbiologie ist neben der funktionellen Analyse der für die Entwicklung notwendigen Gene, die Untersuchung der Gene bzw. ihrer Genprodukte, die relevant sind für die Diagnose, Prävention und Therapie menschlicher Erkrankungen. Die Untersuchung der molekularen und zellulären Funktionen verschiedener Gene während der Embryonalentwicklung oder des Lebenszyklus eines Organismus erfordert die Entwicklung von Modellsystemen, die die systematische und experimentelle Analyse der Genfunktion erlauben. Aufgrund der Ähnlichkeiten der Genome, entwicklungsbiologischer und biochemischer Signal- bzw. Stoffwechselwege, der Physiologie und der langen Tradition der kontrollierten Zucht (Inzuchtstämme) und klassischen Genetik stellt die Maus das ideale Hauptmodellsystem zum Studium der Entwicklungskontrollgene sowie der Genetik und Pathogenese menschlicher Fehlbildungssyndrome dar. Bereits frühzeitig wurde erkannt, daß hierbei die Untersuchung von Mutanten eines der wertvollsten Werkzeuge ist, um tiefgreifende Einblicke in die Genfunktion während der Entwicklung der Wirbeltiere und besonders der Säugetiere zu erhalten (MCLAREN, A. 1976).

In letzter Zeit sind die Vorzüge der klassischen Mausgenetik jedoch etwas in den Hintergrund geraten. Die Gründe hierfür liegen vor allem in genetischen Ansätzen in anderen Modellorganismen. Die Einfachheit der großangelegten genetischen Untersuchungen in *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* und *Danio rerio* haben diese zu vielverwendeten Organismen für Phänotyp-basierende Genidentifizierungen gemacht. Dieser Ansatz führt jedoch schnell an seine Grenzen, da sich die Entwicklung der Säugetiere grundsätzlich von der Entwicklung dieser Modellorganismen unterscheidet. Betrachtet man zum Beispiel die frühen Abläufe im Embryo, so beginnt die Transkription im Säugetierembryo bereits Tage vor der Gastrulation, so daß die kritischen Ereignisse wie die Determination der Keimblätter und die frühe Morphogenese von zygotisch

transkribierten Genen und weniger von bereits vorher abgelegten maternalen Faktoren beeinflusst wird. Während der intrauterinen Entwicklung hängt das Überleben des Säugetierembryos nach der Implantation im Wesentlichen von der Ausbildung einer Reihe von physikalischen Verbindungen zwischen dem Embryo und dem maternalen Blutkreislauf, einschließlich der Plazenta, die keinerlei vergleichbare Struktur in den Invertebraten oder Fischmodellsystemen hat, ab. Weiterhin kann es keine einfachen Beziehungen zwischen den beobachteten Phänotypen homologer Gene z.B. in Fisch- und Mausmutanten geben, da es scheinbar zusätzliche Genomduplikationen in der Teleostlinie gegeben hat (APARICIO, S. 1998). Diese haben z.B. dazu geführt, daß es sieben Hox-Cluster in Zebrafisch und nicht nur vier wie in Säugetieren gibt (AMORES, A. ET AL. 1998). Diese Faktoren zeigen deutlich, daß die Maus eine der wertvollsten Ressourcen zur Untersuchung der Genfunktion im Menschen ist.

1.3.1 Erzeugung von Mausmutanten

Heute sind neben der Vielzahl der spontanen Mutationen die strahlen- und chemisch-induzierten Mutationen von zunehmender Bedeutung (Übersicht bei BEDELL, M.A., ET AL. 1997A und DOOLITTLE, D.P., ET AL. 1996). Hierzu zählt vorallem die große Gruppe der durch ENU (N-Ethyl-N-Nitrosourea)-Mutagenese (BROWN, S.D. UND BALLING, R. 2001) erzeugten Mutanten, die für die großangelegten Phänotyp-basierenden Ansätze zur Genidentifikation erzeugt werden. Neben diesem Phänotyp-basierenden Ansatz ist ein Gen-basierender Ansatz der ENU-Mutagenese in ES-Zellen sehr vielversprechend, da hier davon ausgegangen wird, eine Reihe von allelischen Mutationen in einem definierten Gen zu erzeugen, die dann sowohl Verlust- oder Zugewinn-Mutationen, als auch dominante wie rezessive Mutationen in einem Gen repräsentieren können, um zum Verständnis der Genfunktion beizutragen (CHEN, Y. ET AL. 2000). Zusätzlich zu diesen ungerichteten Methoden ist die reverse Genetik von entscheidender Wichtigkeit, um zum Verständnis von Genfunktion beizutragen, da sie von einer direkten gerichteten Manipulation der Keimbahn der Maus ausgeht, um von einem bekannten Gen gezielt Mausmutanten zu erzeugen. Hierzu können entweder transgene Tiere durch die pronukleäre Mikroinjektion von DNA erzeugt werden oder es kann die bevorzugte gezielte Mutagenese in der Maus („gene targeting“) eingesetzt werden. Hierdurch kann die Keimbahn der Maus in einer vorherbestimmten Weise verändert werden und Mausmutanten mit einer definierten Mutation in ihrem Genom geschaffen werden, die die Funktionsanalyse eines jeden klonierten Gens *in vivo* erlaubt (Übersicht bei HOGAN, B. ET AL. 1994; TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997; JOYNER, A.L. 1999).

Die Grundlage für die „gene targeting“-Technik liegt in der Verwendung von undifferenzierten pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus, die sich zu allen Organen und Geweben eines Organismus entwickeln können. Diese Zellen wurden 1981 erstmalig aus Prä-Implantationsembryonen gewonnen (EVANS, M.J. UND KAUFMANN, M.H. 1981; MARTIN, G. 1981). Nach ihrer Isolation konnte gezeigt werden, daß diese Zellen in der Lage sind, nach der Übertragung in einen Mausembryo an der normalen Entwicklung des Embryos teilzunehmen. Sie können zur Entwicklung aller drei Keimblätter und der Keimbahn in chimären Mäusen beitragen und sind somit fähig ihre genetischen Informationen an ihre Nachkommen weiterzugeben (BRADLEY, A. ET AL. 1984). Kurz danach gelang es erstmalig das endogene Allel eines Gens in ES-Zellen durch homologe Rekombination durch eine in die Zellen transfizierte mutierte Version dieses Gens auszutauschen und diese ES-Zellen erfolgreich zur Erzeugung von Mäusen zu verwenden (THOMAS, K. UND CAPECCCHI, M. 1987; DOETSCHMANN, T. ET AL. 1988; KOLLER, B.H. ET AL. 1989). Seitdem ist die Technik kontinuierlich weiter verbessert worden und als Konsequenz die Anzahl der durch gezielte Mutagenese erzeugten Mausmutanten drastisch angestiegen (Übersicht bei BRANDON, E.P. ET AL. 1995; BEDELL, M.A., ET AL. 1997B). Die sich entwickelnde Flexibilität der Technik ermöglicht es heute eine Vielzahl von verschiedenen Mausmutanten zu erzeugen, die entweder konstitutive Geninaktivierungen („knock-out“), subtile Mutationen, Gen-Austausch, -Inversion, -Deletion, chromosomale Translokationen oder zeit- sowie gewebespezifisch aktivierte oder inaktivierte endogene oder Fremdgene („knock-in“) tragen.

Trotz der Vielzahl verschiedener Anwendungsmöglichkeiten ist die Technik, um genetisch veränderte Mäuse zu erzeugen, bei allen Ansätzen im Wesentlichen gleich. Basierend auf dem zu bearbeitenden biologischen Problem oder der experimentellen Fragestellung muß die optimale Strategie erarbeitet werden und das erforderliche bzw. angemessene Design des Vektors, der erforderlich ist, um die gewünschte Veränderung in das Genom der ES-Zellen einzubringen, gewählt werden („Replacement“-Typ oder „Insertion“-Typ Vektoren). Nach der Konstruktion des Vektors erfolgt durch Elektroporation, die die Methode der Wahl darstellt, die Transfizierung der ES-Zellen mit dem Mutagenese-Vektor. Neben der Qualität der ES-Zellen und den optimalen Kulturbedingungen, die die Pluripotenz der Zellen erhalten sollen (Übersicht bei ROBERTSON, E. 1989), sind verschiedene Faktoren für eine nachfolgende erfolgreiche homologe Rekombination in den ES-Zellen und somit schließlich für die Erzeugung von genetisch veränderten Mäusen entscheidend. Zu diesen Faktoren zählen neben dem Ziellokus bzw. der Lokusregion selbst, vorallem die Länge der im Vektor verwendeten homologen DNA, die

transkriptionale Aktivität des Ziellokus, die Penetranz der verwendeten Selektionsgene und schließlich die Verwendung von isogener DNA für die Konstruktion des verwendeten Vektors (Übersicht bei FROHMAN, M.A. UND MARTIN, G.R. 1989, FUNG-LEUNG, W.P. UND MAK, T.W. 1992, TERIELE, H. ET AL. 1992; VAN DEURSEN, J. UND WIERINGA, B. 1992). Aufgrund der geringen Transformationseffizienz (10^{-3}) und der noch geringeren Frequenz der homologen Rekombination muß eine Anreicherung der genetisch veränderten ES-Zellen erfolgen. Zur Anreicherung der wenigen homolog rekombinierten Zellen wird in der Regel eine positive Selektion verwendet, die durch das am häufigsten eingebrachte prokaryontische Neomycin Phosphotransferase-Gen, das die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 verleiht, ermöglicht wird. Weiterhin kann diese positive Selektion der transfizierten ES-Zellen noch mit einer negativen Selektion (z.B. *Thymidin Kinase*-Gen oder *Diphtheria Toxin A*-Gen) verbunden werden (MANSOUR, A. ET AL. 1988), um die homolog rekombinanten Zellen gegenüber den nicht-homolog rekombinanten zusätzlich anzureichern. Schließlich müssen die erhaltenen ES-Zellklone isoliert und durch PCR-basierende Strategien oder durch Filterhybridisierungen eindeutig charakterisiert werden. Hieran schließt sich die Erzeugung der chimären Mäuse mit diesen genetisch veränderten ES-Zellen und die Etablierung von Mauslinien an, die die gewünschte Veränderung stabil in ihr Genom integriert haben und diese an ihre Nachkommen weitergeben können (Übersicht bei WASSARMAN, P.M. UND DE PAMPHILIS, M.L. 1993; HOGAN, B. ET AL. 1994; TORRES, R.M UND KÜHN, R. 1997; JOYNER, A.L. 1999).

1.3.2 Verwendung von Mausmutanten

Durch die verschiedenen Möglichkeiten der gezielten Veränderung von Genen, die mit der homologen Rekombination in ES-Zellen beginnt und über die Erzeugung von chimären Tieren in der Etablierung neuer mutanter Mauslinien endet, sind somit eine Vielzahl von Erkenntnissen über die Genfunktion und -regulation im Organismus während der Embryonalentwicklung und des normalen Lebenszyklus zu erwarten, die zu einem besseren Verständnis von entwicklungsrelevanten und pathogenetischen/-physiologischen Prozessen beitragen werden. Einen ersten Eindruck von der Vielzahl der bereits vorhandenen Mausmutanten, die durch gezielte Mutagenese entstanden sind, und den damit verbundenen Möglichkeiten der Analyse entwicklungsbiologischer Vorgänge kann man sich unter Verwendung der vielen Internet-Datenbanken verschaffen, wie z.B.:

TBASE	http://tbase.jax.org/
IMR	http://www.jax.org/resources/documents/imr/
Database of Gene Knockouts	http://www.bioscience.org/knockout/knohome.htm

BioMedNet	http://biomednet.com/db/mkmd
EMMA	http://www.emma.rm.cnr.it/
DHMHD	http://www.hgmp.mrc.ac.uk/DHMHD/dysmorph.html
Whole Mouse Catalog	http://www.rodentia.com/wmc/

Insgesamt sind bereits mehr als 1000 Gene bekannt, die für die Ausbildung monogener Erkrankungen im Menschen verantwortlich sind oder zu einer erhöhten Suszeptibilität für komplexe Erkrankungen beitragen (Übersicht in „Online Mendelian Inheritance in Man“ (OMIM) unter www.ncbi.nlm.nih.gov und bei ANTONARAKIS, S.E. UND MCKUSICK, V.A. 2000). Hiervon sind weit mehr als 100 Gene, deren Homolog im Menschen ursächlich für die Ausbildung eines Fehlbildungssyndromes ist oder maßgeblich an der Pathogenese dieser Fehlbildungen beteiligt ist, durch Mutantenanalysen oder gezielte Mutationen in der Maus untersucht worden (Übersicht bei BEDELL, M.A., ET AL. 1997B). So konnten z.B. wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der Pathogenese der Hirschsprung's Krankheit (MIM 142623), dem Fehlen von intestinalen Ganglien, dem damit verbundenen Megacolon, den Verengungen oder Verschlüssen des Dünndarms und dem chronischen Erbrechen, durch die Untersuchung der Mäuse, die eine homozygote Nullmutation für das Proto-Onkogen *Ret* tragen (SCHUGHARDT, K. ET AL. 1994), gewonnen werden (VAN HEYNINGEN, V. 1994; CHAKRAVARTI, A. 1996). Neben den Fehlbildungen der Abkömmlinge der Neuralleiste, stellen die des Skeletts ein weiteres Beispiel dar. Hierbei hat die detaillierte phänotypische und molekulare Analyse der Mausmutanten, die eine gezielte Mutation im *Fgfr3*-Gen tragen, gezeigt, daß sie ein verstärktes Wachstum der Röhrenknochen aufweisen und somit genau den gegenteiligen Phänotyp zu den Patienten, die an Thanatophorer Dysplasie (MIM 187600), Achondrodysplasie (MIM 100800) oder Hypochondroplasie (MIM 146000) leiden, zeigen. Basierend auf diesen genetischen Daten kann davon ausgegangen werden, daß *Fgfr3* ein negativer Regulator des Knochenwachstums ist und daß die in den Patienten gefundenen Punktmutationen in *FGFR3* zu einer konstitutiven Aktivierung von FGFR3 führen (BELLUS, G.A. ET AL. 1995; MÜENKE, M. UND SCHELL, U. 1995; COLVIN, J.S. ET AL. 1996; DENG, C.-X. ET AL. 1996). Weiterhin können die Untersuchungen an verschiedenen Mausmutanten einen wichtigen Beitrag liefern, um eine Verbesserung der Diagnose und vorallem der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen (bes. Artherosklerosis), die zu den häufigsten Todesursachen zählen, zu erreichen. So sind z.B. die Mausmutanten für *Ldlr* und *ApoE* sehr hilfreich, um zu verstehen, wie sich atherosklerotische Läsionen bilden und welche Einflüsse der Cholesterol-Stoffwechsel auf die Pathogenese der Erkrankung hat. Die

Mausmutanten stellen somit gute Modellsysteme für sporadische aber auch vererbte Krankheitsformen, wie die Familiäre Hypercholesterolemie (MIM 143890) oder die Hyperlipoproteinämie Typ III (MIM 107741) dar. Die detaillierten Analysen der einzelnen Mausmutanten und der Mutanten, die beide Veränderungen gleichzeitig tragen, können vielfältigen Aufschluß über die molekularen intra- und interzellulären Abläufe während der Krankheitsentwicklung geben und somit zu einer Verbesserung der Diagnose und der Therapie beitragen (GOLDSTEIN, J.L. ET AL. 1995; KNECHT, T.P. UND GLASS, C.K. 1995; MAHLEY, R.W. UND RALL JR., S.C. 1995).

Insgesamt wird somit deutlich, daß in nächster Zeit die Erzeugung und Verwendung von Mausmodellen in Kombination mit der Nutzung der zur Verfügung stehenden vollständigen Sequenzen des menschlichen Genoms (VENTER, J.C. ET AL. 2001) und der zugänglichen Gesamtsequenz des Mausgenoms (MARSHAL, E. 2001; www.celera.com) von großer Bedeutung für das Verständnis der Genfunktion während der Entwicklung aber auch während der Entstehung von Krankheiten sein wird. Durch die Verfügbarkeit der Genomsequenzen wird die Identifizierung und Charakterisierung der Krankheiten verursachenden Gene erleichtert (JIMENEZ-SANCHEZ, G. ET AL. 2001) und es wird möglich sein, ein im Menschen identifiziertes Gen zügig in der Maus zu isolieren und durch gezielte Mutagenese auszuschalten. Hierbei ist es aber nicht vorrangig, ein Abbild der beobachteten phänotypischen Veränderungen darzustellen, sondern gleichzeitig die Möglichkeit zur detaillierten molekularen Analyse der betroffenen Stoffwechsel- oder Signalwege in einem definierten genetischen Hintergrund zu nutzen. Hierdurch können wichtige Erkenntnisse für die Aufschlüsselung der für die normale Entwicklung notwendigen Abläufe und die zugrunde liegenden genetischen Netzwerke gewonnen werden. Außerdem kann es durch die Verwendung verschiedener definierter genetischer Hintergründe zur Identifikation und Isolation von Genen kommen, die modifizierend auf die Funktion einzelner Gene bzw. ihrer Genprodukte einwirken. Neben diesem Nutzen zum Verständnis der Vorgänge während der Embryonalentwicklung, sind diese Mäuse noch von hohem klinischen bzw. therapeutischen Wert, da sie neben der Optimierung der Diagnose zur Etablierung oder Verbesserung von Behandlungsmöglichkeiten, einschließlich der Gentherapie, verwendet werden können.

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die Betrachtung der zuvor beschriebenen *Gli3*-Mausmutanten und der Krankheitsbilder der Patientengruppen mit *GLI3*-Mutationen zeigen, daß durch die Mutationen in nur einem Gen es zur gleichzeitigen Beeinflussung mehrerer Merkmale (Pleiotropie) kommt. Besonders die Vielzahl der beobachteten verschiedenartigen Phänotypen (Polyphänie) in Patienten mit Mutationen im *GLI3*-Gen weisen auf eine entscheidende und weit verbreitete Funktion von *Gli3* während der Embryonalentwicklung hin. Hierbei ist auffällig, daß es durch Mutationen in bestimmten Regionen von *GLI3*, N- bzw. C-terminal der Zink-Finger Region, zu unterschiedlichen Phänotypen in einzelnen Patientengruppen kommt. Hierunter sind neben zwei Syndromen (GCPS und PHS), das heißt, daß in diesen Patienten ein Krankheitsbild vorliegt, das sich aus verschiedenen einzelnen Symptomen zusammensetzt, auch drei isolierte, in ihrer Auswirkung sehr milde Fehlbildungen (PPD IV, PAP-A und PAP-A/B) zu finden, die sich auf die Extremitäten bzw. den Autopod begrenzen. Im Gegensatz dazu sind besonders in den PHS-Patientengruppen Organe bzw. Organsysteme betroffen, für die, aus der Analyse der bekannten Mausmutanten, bisher kein Einfluß von *Gli3* auf die normale Entwicklung beschrieben worden ist. Hierbei stellt sich die Frage wie sich die beobachteten Phänotypen im homozygoten Zustand darstellen und ob die betroffenen Strukturen stärker betroffen sind oder aber noch zusätzliche Strukturen durch die *Gli3*-Mutationen in ihrer Entwicklung gestört sind. Neben den morphologischen und anatomischen Fragestellungen der phänotypischen Ausprägung der einzelnen Genotypen sind besonders die molekularen Veränderungen der für ihre Determination und Differenzierung notwendigen Signalwege bzw. genetischen Netzwerke von besonderem Interesse. Durch die Analyse dieser Signalwege können nicht nur eine Vielzahl neuer Erkenntnisse über die Bedeutung von *Gli3* für die Entwicklung eines einzelnen Organs oder Organsystems gewonnen werden, sondern auch über die Interaktionen verschiedener Signalwege während der Entwicklung.

Einen ersten Ansatzpunkt für den Einstieg in diese Analysen bzw. die Aufklärung der *Gli3*-Funktion können die in ihrer Ausprägung in den Patienten grundsätzlich verschiedenen Polydaktylie-Formen der einzelnen *GLI3*-Mutationen sein. Der Versuch die qualitativ verschiedenen Formen der Polydaktylie (präaxial, zentral, postaxial) im Modellorganismus Maus, in dem alle bisher bekannten *Gli3*-Mutationen nur zu präaxialen Polydaktylien (siehe 1.2.3) führen, nachzustellen (Phänokopie) kann, unterstützt durch die molekularen Analysen, dazu beitragen, daß die Funktion unterschiedlicher *Gli3*-Formen während der Gliedmaßenentwicklung verstanden werden kann. Die ausführliche

Untersuchung der dann eventuell beobachteten präaxialen, zentralen und postaxialen Gliedmaßen-Phänotypen und die hierbei gefundenen Wechselwirkungen können hilfreich zur Aufklärung der *Gli3*-Genfunktion im Shh-Signalweg und während der Organogenese der einzelnen betroffenen Strukturen sein. Hierdurch wird die Analyse der Wechselwirkung mit anderen komplexen genetischen Netzwerken während der Entwicklung des Gesamtorganismus ermöglicht. Der Grund dafür ist, daß die Gliedmaßenentwicklung als ein klassisches Modellsystem der Entwicklung verstanden werden kann, an dem grundlegende entwicklungsbiologische Fragestellungen untersucht werden können. Die Ursachen hierfür sind unter anderen, daß die bei der Gliederung des Körperbauplans angewendeten Prinzipien bei der Musterbildung der Gliedmaßen wiederzufinden sind und die für die Gliedmaßenbildung verantwortlichen Moleküle an anderen Stellen und zu anderen Zeiten im sich entwickelnden Vertebraten-Embryo wiederzufinden sind. (Übersicht bei SAUNDERS, J.W. UND GASSELING, M.T. 1968; TICKLE, C. 1981; RIDDLE, R.D. ET AL. 1993; COHN, M.J. UND TICKLE, C. 1996; JOHNSON, R. UND TABIN, C. 1997).

Das Ziel der Arbeit ist es eine Auswahl der im Menschen identifizierten *GLI3*-Mutationen (C-terminal der Zink-Finger Region; PHS (Position 2194)- KANG, S. ET AL. 1997; PAP-A (Position 2463)- RADHAKRISHNA, U. ET AL. 1997B) und eine intermediär gelegene (Position 2402) durch homologe Rekombination in das *Gli3*-Gen der Maus einzubringen, um die im Menschen gefundenen Veränderungen nachzustellen. Diese gerichtete Manipulation des Mausgenoms soll die Analyse der phänotypischen sowie molekularen Konsequenzen der jeweiligen Mutation in der Maus ermöglichen, um die funktionellen Auswirkungen der einzelnen Mutationen zu untersuchen. Hieraus können sich weitere Einblicke in die *Gli3*-Genfunktion während der Embryonalentwicklung ableiten und es läßt sich eine mögliche Struktur-Funktionsbeziehung und eine potentielle Genotyp-Phänotyp-Korrelation hinterfragen, da die gezielt eingebrachten Mutationen im Gegensatz zu den bisher bekannten *Gli3*-Mutationen (siehe 1.2.3) C-terminal der Zink-Finger Region lokalisiert sind. Unter Verwendung der Informationen des bekannten kodierenden Bereichs der *Gli3*-cDNA (THIEN, H., ET AL. 1996; Genbank #NM_008130) sollen zunächst die erforderlichen genomischen Fragmente isoliert werden, die die Grundlage für die Erstellung der Mutagenese-Vektoren darstellen. Diese Vektoren werden anschließend verwendet, um das *Gli3*-Gen in embryonalen Stammzellen der Maus durch homologe Rekombination gezielt zu verändern. Darauf folgt die Etablierung der eindeutig charakterisierten ES-Zelllinien mit der jeweiligen gezielten Veränderung des *Gli3*-Gens

und die Verwendung dieser ES-Zelllinien zur Erzeugung chimärer Mäuse. Diese können zur Etablierung neuer Mauslinien, die die gewünschte Veränderung des *Gli3*-Gens tragen und an ihre Nachkommen weitervererben, verwendet werden. Die phänotypische sowie molekulare Charakterisierung dieser Mausmutanten erlaubt schließlich die Auswirkungen der einzelnen Mutationen auf die Embryonalentwicklung zu untersuchen.

2 Material und Methoden

Die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden soweit nicht anders erwähnt von den Firmen Applichem GmbH, J.T. Baker, Fluka, New England Biolabs (NEB), Merck, Riedel de Haën, Roche Molecular Biochemicals, Roth und Sigma bezogen. Die erforderlichen Lösungen, Puffersysteme und Spezialchemikalien werden bei den einzelnen Methoden entsprechend ihrer Verwendung beschrieben. Zum Ansetzen der Lösungen wurde Wasser aus einer Millipore-MilliQ-Anlage verwendet. Bei Bedarf wurden die Lösungen, Gefäße, Geräte und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121°C; 2bar für 30 min., Filtrieren oder durch trockene Hitze bei 180°C für 30 min. sterilisiert. Die eingesetzten Geräten und Verbrauchsmaterialien, sofern nicht bei den einzelnen Methoden besonders erwähnt, sind die in einem molekularbiologisch arbeitenden Labor im Allgemeinen verwendeten.

2.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme wurden in der Regel zusammen mit ihrem jeweiligen Reaktionspuffer bezogen und entsprechend den vom Hersteller (NEB; Roche) vorgegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

In einem üblichen Reaktionsansatz, mit einem Gesamtvolumen von 20 µl konnten bis zu 5 µg DNA von einer Enzymaktivität von 10 U innerhalb einer Stunde gespalten werden. Für die meisten Enzyme war eine Inkubation bei 37°C erforderlich.

Der Reaktionsansatz wurde in der Regel gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5). Nach einer präparativen Spaltung zur Linearisierung von Plasmiden oder zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde entweder eine Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung (siehe 2.4) durchgeführt, oder die DNA-Fragmente wurden zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und schließlich aufgereinigt (siehe 2.6).

2.2 Dephosphorylierung von DNA

Nach der Spaltung von Vektoren mit nur einem Restriktionsenzym wurden diese mit dem Enzym alkalische Phosphatase (Roche) behandelt, um die Häufigkeit eines unerwünschten Wiederverbindens der erzeugten komplementären Enden zu verringern. In der Regel wurden dem Restriktionsansatz die den Herstellerangaben entsprechende Menge Reaktionspuffer und eine Enzymaktivität von 1 U alkalischer Phosphatase zugesetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente aufgereinigt. Dies erfolgte entweder durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Präzipitation (siehe 2.4), oder gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende Gelextraktion (siehe 2.6).

2.3 Umwandlung von überhängenden kohäsiven Enden in stumpfe Enden

Für einige Klonierungsansätze war es notwendig, die durch einen Restriktionsansatz erzeugten überhängenden kohäsiven Enden der DNA-Fragmente oder Vektoren in glatte Enden umzuwandeln. Hierzu wurde entweder das Klenow-Fragment oder die „Mung Bean“-Nuklease verwendet. Bei Verwendung des Klenow-Fragments wurden nach der Inkubation eines Restriktionsansatzes 1 µl dNTP-Gemisch (0,5 mM) und 5 U Klenow-Fragment (NEB) zugegeben und für 20 min. bei 37°C inkubiert. Bei Anwendung der „Mung Bean“-Nuklease (NEB) wurde nach Zugabe des Reaktionspuffers und des Enzyms (1 U/µg DNA) für 30 min. bei 30°C inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurden die behandelten DNA-Fragmente oder Vektoren entweder durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Präzipitation (Siehe 2.4), oder gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende Gelextraktion (siehe 2.6) aufgereinigt.

2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung

Die aufzureinigenden Proben wurden zunächst mit Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Es wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform zugegeben und nach gründlicher Durchmischung zur Unterstützung der Phasentrennung zentrifugiert (5 min.; 13200 Upm; Eppendorf 5415D). Nach der Zentrifugation wurde die obere, wäßrige DNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und die proteinhaltige Interphase sowie die organische Phase verworfen. Zur Präzipitation der DNA wurde zu der wäßrigen Phase 0,1 Volumen Natriumacetat und 3 Volumen Ethanol (abs.) gegeben, gut durchmischt und 30 min. bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (10 min.; 13200 Upm; Eppendorf 5415D) sedimentiert. Abschließend wurde mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen, kurz zentrifugiert, der Überstand vollständig abgesaugt und das an der Luft getrocknete Zentrifugat in einem angemessenen Volumen TE oder Wasser aufgenommen.

Lösungen :	Phenol/Chloroform	3:1; TE gesättigt
	Natriumacetat	3 M; pH 5,2
	Ethanol abs.	
	70% Ethanol	
	TE	10 mM Tris/HCl
		1 mM EDTA
		pH 8,0

2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Als Gel- sowie als Laufpuffer diente das TAE-Puffersystem. In Abhängigkeit von der Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einem Anteil von 0,8 - 2 % (w/v) Agarose eingesetzt. Die aufgekochte Agaroselösung wurde mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid

versetzt und die zu analysierenden Proben vor Beladung des Gels mit 5 µl DNA-Auftragspuffer vermischt.

Zur späteren Größen- und Mengenabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde zusätzlich, folgende ebenfalls mit DNA-Auftragspuffer versetzte, restriktionsenzymatisch gespaltene Bakteriophagen-DNA als Längenstandard aufgetragen :

1kb-DNA-Leiter : 12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506,517; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp (GibcoBRL #15615-024)

λ-Hin dIII : 23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564; 125 bp (Stratagene #201109)

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstant gehaltenen Spannung von 5 Volt/cm bei Raumtemperatur. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (254 nm) durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und mit einer PC-gestützten Videodokumentationsanlage fotografiert.

Lösungen :	TAE	40 mM Tris/Acetat 2 mM EDTA pH 8,2	
	Agarose		- Applichem #A1091
	Ethidiumbromid	10 mg/ml	- Applichem #A1152
	Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin 2% (w/v) Orange G in TAE	- Merck #14277

2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht möglichst exakt ausgeschnitten. Zur Isolierung wurde der „High Pure PCR Purification Kit“ (Roche #1732676) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde dann mit 50 µl des mitgelieferten Elutions-Puffer oder Wasser aus den Filtereinsätzen eluiert. Die Qualität und Konzentration der erhaltenen DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.5) überprüft.

Lösungen : Ethanol abs.
Isopropanol

2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verbindung von DNA-Restriktionsfragmenten, die glatte oder kohäsive überhängende Enden aufwiesen, wurde mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 durchgeführt. Die Ligation erfolgte, indem zunächst die aufgereinigte Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von ungefähr 1:3 eingesetzt wurde. Die DNA wurde mit 3 µl 10x Ligase-Puffer und 2 µl T4-Ligase (beides GibcoBRL) vermischt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 16°C für 12-16 Stunden.

Die Hälfte des Ligationsansatzes konnten im Anschluß für die Transformation von kompetenten Bakterien (siehe 2.8.2) eingesetzt werden, der Rest wurde bei 4°C gelagert.

2.8 Transformation von Plasmiden in *Escherichia coli*

2.8.1 Herstellung kompetenter Zellen

Als bakterieller Wirt wurde der *Escherichia coli* Stamm JM109 (*recA1*, *lacZ*ΔM15) verwendet. Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte nach dem Protokoll von INOUE, H. ET AL. 1990.

Zunächst wurde eine Einzelkolonie verwendet, um eine Vorkultur in 20 ml LB-Medium anzuküpfen, die über Nacht bei 37°C unter Schütteln auf einem Plattformschüttler (120 Upm) inkubiert wurde. Diese diente als Inokkulum für eine 250 ml-Hauptkultur in SOB-Medium. Die Kultur wurde bei Raumtemperatur unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀=0,93 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde nach Erreichen der OD₆₀₀ für 10 min. auf Eis gestellt, 10 min. bei 2500 x g (Heraeus, Megafuge 1.0R) und 4°C zentrifugiert und das erhaltene Bakteriensediment in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von DMSO zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) für 10 min. auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Aliquotierung der Zellen in 200 µl Portionen und, nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, die Lagerung bei -80°C.

Lösungen :	LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
		1% (w/v) Trypton	- Applichem #A1553
		0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in H ₂ O	- Applichem #A1552
		autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	SOB-Medium	2% (w/v) Trypton	- Applichem # A1553
		0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	- Applichem # A1552
		10 mM NaCl	
		2,5 mM KCl	
		10 mM MgCl ₂	
		10 mM MgSO ₄	
		pH 6-7-7	
	TB-Puffer	10 mM PIPES	
		55 mM MnCl ₂	
		15mM CaCl ₂	
		250 mM KCl	
		pH 6,7	

2.8.2 Transformation

Zur Transformation wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien zügig aufgetaut und zusammen mit der Plasmid-DNA (20-100 ng) für 15 min. auf Eis inkubiert. Darauf folgend wurden die Bakterien einem kurzen Hitzeschock (45 sec.; 42°C) ausgesetzt

und nach der Zugabe von 0,8 ml LB-Medium wurden die Zellen für 30-45 min. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert (3 min.; 6000 Upm; Eppendorf 5415D), das Sediment in ungefähr 100 µl LB-Medium resuspendiert und die Suspension in Abhängigkeit von der kodierte Antibiotikaresistenz des verwendeten Plasmids auf antibiotikahaltigen Selektivnährböden ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die herangewachsenen Bakterienkolonien transformierter Zellklone konnte für das Animpfen von Flüssigkulturen verwendet werden, die primär eine Analyse der Klone ermöglichen und schließlich der Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA dienen.

Lösungen :	LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
		1% (w/v) Trypton	- Applichem #A1553
		0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	- Applichem #A1552
		in H ₂ O	
		autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	Nährböden	1,5% (w/v) Bacto-Agar	- Applichem #A0949
		50 µg/ml Ampicillin oder	- Applichem #A0839
		25 µg/ml Kanamycin	- Applichem #A1493
		80 µg/ml X-Gal	- Applichem #A1007
		0,2 mM IPTG	- Applichem #A1008
		in LB-Medium	

2.9 Präparation von Plasmid-DNA

Die beiden hier beschriebenen Methoden stellen Modifikationen der alkalischen Lyse-Methode von BIRNBOIL, H. C. UND DOLY, J. (1979) und BIRNBOIL, H. C. (1983) dar.

2.9.1 Plasmid-Mini-Isolation

Jeweils 2 ml Selektionsmedium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für minimal fünf Stunden maximal über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. 1,5 ml dieser Kulturen wurden abgenommen, abzentrifugiert (3 min.; 6000 Upm; Eppendorf 5415D) und das Bakteriensediment in 100 µl kalter Lösung I vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von Lösung II und erfolgter alkalischer Lyse wurden die Proben durch Zugabe von 150 µl kalter Lösung III neutralisiert. Die voluminösen Niederschläge wurden sedimentiert (10 min.; 13200 Upm; Eppendorf 5415D) und die klaren plasmidhaltigen Überstände vollständig in neue Gefäße überführt. Die Nukleinsäuren wurde durch Zugabe von 1 ml kaltem Ethanol (abs.) und erneuter wie zuvor beschriebener Zentrifugation präzipitiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Nukleinsäure-Niederschlag wurde mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentrifugiert (2 min.; 13200 Upm; Eppendorf 5415D), der Überstand vollständig abgesaugt und das kurz an der Luft getrocknete Zentrifugat in 25 µl TE aufgenommen.

5 µl der resuspendierten DNA wurden für eine analytische restriktionsenzymatische Spaltung eingesetzt und die Restriktionsfragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Lösungen :	LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
		1% (w/v) Trypton	- Applichem #A1553
		0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	- Applichem #A1552
		in H ₂ O	
		autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	Selektionsmedium	50 µg/ml Ampicillin oder	- Applichem #A0839
		25 µg/ml Kanamycin	- Applichem #A1493
		in LB-Medium	
	Lösung I	25 mM Tris/HCl	
		10 mM EDTA	
		100 mg/ml RNase A	
		pH 8,0	
	Lösung II	0,2 N NaOH	
		1% (w/v) SDS	
	Lösung III	294,5 g Kaliumacetat	
		110 ml Eisessig	
		auf 1 l H ₂ O	
		pH 5,5	
	Ethanol abs.		
	70% Ethanol		
	TE	10 mM Tris/HCl	
		1 mM EDTA	
		pH 8,0	

2.9.2 Plasmid-Maxi-Isolation

Plasmid-DNA mit hoher Reinheit und im größeren Maßstab (100 µg bis zu 1 mg) wurde unter Verwendung des „QIAGEN Plasmid Kit“ („Midi“ bis 100 µg - QIAGEN GmbH #12145; „Maxi“ bis 500 µg - QIAGEN GmbH #12163) isoliert.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden je nach benötigter Plasmid-Menge 50 oder 100 ml Selektionsmedium mit einem Teil der aufbewahrten Bakteriensuspension der zuvor analysierten Plasmid-Mini-Isolation angeimpft. Nach erfolgter Inkubation auf einem Plattformschüttler (120Upm) über Nacht bei 37°C wurde entsprechend den Herstellerangaben verfahren. Die an der Luft vollständig getrocknete Plasmid-DNA wurde in einem angemessenen Volumen TE oder H₂O aufgenommen und die gelöste DNA wurde spektralphotometrisch quantifiziert (siehe 2.11) und zur Überprüfung der DNA-Qualität restriktionsenzymatisch (siehe 2.1) und gelelektrophoretisch (siehe 2.5) analysiert.

Lösungen :	LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
		1% (w/v) Trypton	- Applichem #A1553
		0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	- Applichem #A1552
		in H ₂ O	
		autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	Selektionsmedium	50 µg/ml Ampicillin oder	- Applichem #A0839
		25 µg/ml Kanamycin	- Applichem #A1493

	in LB-Medium
70% Ethanol	
TE	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0

2.10 Isolierung von Nukleinsäuren aus eukaryontischen Zellen und Geweben

2.10.1 Isolierung von DNA aus Schwanzgewebe und extraembryonalen Membranen

Hierzu wurden ca. 0,2-0,5 cm Schwanzgewebe erwachsener Tiere bzw. die extraembryonalen Membranen isolierter Embryonen mit 750 µl Lyse-Puffer und 50 µl Proteinase K versetzt und über Nacht bei 56°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden 250 µl gesättigter Kochsalzlösung zugegeben, kurz geschüttelt und 10 min. bei 13200 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml des Überstandes vorsichtig abgenommen und mit 500 µl Isopropanol zur DNA-Präzipitation vermischt. Nach kurzem Schütteln wurde 5 min. bei 13200 Upm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, der Niederschlag mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und nach Lufttrocknung in 50-100 µl H₂O resuspendiert. Die erhaltene genomische DNA konnte direkt in den weiterführenden Analysen eingesetzt werden.

Lösungen :	Lyse-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8 100 mM EDTA, pH 8 100 mM NaCl 1% (w/v) SDS	
	Proteinase K	10 mg/ml	– Roche #1000144
	gesättigte Kochsalzlösung		
	Isopropanol		
	70% Ethanol		

2.10.2 DNA Mikroextraktion aus 96-Loch Platten

Hierzu wurde eine Modifikation des Protokolles von RAMÍRES-SOLIS, R. ET AL. 1992 verwendet. Die in 96-Loch Platten kultivierten ES-Zellen (siehe 2.20.5) konnten für die DNA-Isolation verwendet werden, wenn sie das Kulturmedium durch ihre Stoffwechselaktivität über Nacht verfärbten. Das Medium wurde von den Mehrloch-Platten abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und es wurden 50 µl Lysis-Puffer in jede Vertiefung gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 65°C in einer verschlossenen Schale mit feuchten Papiertüchern inkubiert und am nächsten Tag mit 100 µl eiskalter NaCl/Ethanol-Lösung pro Vertiefung versetzt. Nach erfolgter Präzipitation der DNA (ca. 30 min. bei Raumtemperatur) wurde der Überstand abgeschüttet, die DNA dreimal mit jeweils 150 µl Ethanol (70%) gewaschen, für 10 min. luftgetrocknet und in 20 µl H₂O pro Vertiefung aufgenommen. Um das Lösen der DNA zu unterstützen wurden die

Platten für 10 min. bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die gelöste DNA komplett für die sich anschließenden Filterhybridisierungen (siehe 2.14.2) eingesetzt.

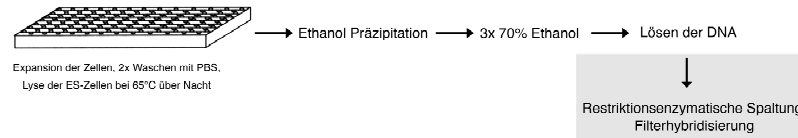


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der DNA Mikroextraktion (modifiziert nach RAMÍRES-SOLIS, R. ET AL. 1992).

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	Lysis-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM EDTA, pH 8 10 mM NaCl 0,5% (w/v) Sarcosyl Proteinase K (1 mg/ml)	- Fluka #61743 - Roche #1000144
	NaCl/Ethanol	10 ml Ethanol abs. + 150 µl 5 M NaCl	
	70% Ethanol		

2.10.3 Isolierung von RNA aus embryonalen Geweben

Frisches oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei –80°C gelagertes Material wurde gewogen und mit 1 ml TRIZOL-Reagenz pro 100 mg Gewebe versetzt. Die einzelnen Proben wurden im Polytron (Stufe 4; Kinematica AG, Luzern) homogenisiert und entsprechend den Angaben des Herstellers weiter verarbeitet. Das RNA-Sediment wurde nach Lufttrocknung in 500 µl DEPC- H₂O aufgenommen und bei –80°C gelagert.

Lösungen :	TRIZOL Reagenz	- GibcoBRL #15596
	Chloroform	
	Isopropanol	
	70% Ethanol	
	DEPC-H ₂ O	H ₂ O +0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonate (DEPC) über Nacht inkubiert; autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.
		- Sigma #D5758

2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Der gemessene Absorptionswert von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm einer Nukleinsäurelösung gegen das entsprechende Lösungsmittel entspricht ungefähr einer Konzentration von :

dsDNA	=	50 µg/ml
RNA	=	35 µg/ml

Die Messungen wurden in einem Spektralphotometer (Pharmacia; Ultrospec2000) mit verdünnten Nukleinsäurelösungen (1:100 oder 1:300 (v/v)) in Quarzglasküvetten unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Der Grad der Verunreinigung der Nukleinsäurepräparation konnte durch Bestimmung des Quotienten der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten bestimmt werden; gering verunreinigte Proben sollten hierbei Werte von 1,8 bis 2,0 ergeben.

2.12 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.12.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')
ZF-F2	GGTTGCACAAAAGCCTACTCAAGAC
ZF-B4	AAATGCTCCCTGAGTTGGCC
hGLI3-F1	CAAAATCCCAGGCTGCTACTAAG
mPHS F1 BamHI	GAGGATCCCTACCTCAAAGCGGGAAGAGTGCC
mPHS B1 BamHI	GTAGGGATCCTCAGCTCCTTCTGCTACCAAATGC
mPAP-A F1 BamHI	CAGGGATCCAATGGATGGAGCACATCAAACCTTG
mPAP-A B1 BamHI	CCATTGGATCCCTGCCGGGTTTCTCCTGGCTGCAAAGCAAGGGC
ZF-B5	GACCACCAGGGCTTGGCTGAGATGTCATTG
ZF-B8	CCTATGAGAGGAGATACCGCAG
3' 52	AGCAACTATTCCAACAGTGG
Seq2403-F1	GATGAAACCCCAATCATGGACTC
Seq-Intron-B1	TGAGCAGACAGACACATGGTCTAGG
Gli3-B2507	TTGATGTGCTCCATCCATTTGGTCCCTGCC
Seq3142-3121	GACGCCCTCTGTATGTGTGACC
3' F4	GGGTGAACAGCATCAAATGGAG
3' B1	TATCGGTACAACCACCACGGGTAC
Neo-F2	TACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTG
Neo-B2	AGAGGCTATTTCGGCTATGACTGG
5' HPRT	CACAGGACTAGAACACCTGC
3' HPRT	GCTGGTGAAAAGGACCTCT

2.12.2 PCR-Amplifikation

PCR-Reaktionen wurden in Eppendorf- (Mastercycle Gradient) oder MWG- (Primus 25) Maschinen unter Verwendung von dünnwandigen 0,2 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden auf Eis angesetzt und als Enzym wurde die *Taq*-Polymerase und das zugehörige Puffersystem von Roche (#1146165) eingesetzt. Der 20 µl-Standardansatz enthielt 0,2 µl *Taq*-Polymerase (2U), 2 µl 10x Reaktionspuffer, 25 pmol dNTP-Gemisch und jeweils 10 pmol der spezifischen Oligonukleotide. Standardmäßig wurden folgende Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der DNA-Fragmente gewählt :

1x	30x	1x
2 min. 45 sec.; 94°C	15 sec.; 94°C	
	30 sec.; 56°-58°C	
	45 sec.; 72°C	
		7 min.; 72°C

Anschließend wurden die PCR-Reaktionen bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei 4°C gelagert.

Lösungen :	dNTP-Gemisch	10mM dATP	- Roche #1969064
		10mM dCTP	
		10mM dGTP	
		10mM dTTP	
	Oligonukleotide	100pmol/µl in H ₂ O	- MWG-Biotech
	H ₂ O	autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	

2.12.3 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde das „Expand Reverse Transcriptase“-System (Roche #1785834) verwendet. Es wurden in der Regel 2 µg Gesamt-RNA und 25 pmol Oligo(dT)- bzw. sequenzspezifischer Oligonukleotide eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Alle Inkubationsschritte wurden in PCR-Maschinen durchgeführt und die Reaktionen anschließend bei 4°C gelagert. Für die anschließende Amplifikation (siehe 2.12.2) der cDNA wurden 2 µl des 20 µl Ansatzes verwendet.

2.13 DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten erfolgte als Auftragssequenzierung. Diese wurden an der Heinrich-Heine Universität im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) mittels „ABI Prism“-Sequenzierautomat oder in Gemeinschaft mit der Abteilung für Molekulare Parasitologie unter Verwendung eines „Licor“-Sequenzierautomaten durchgeführt.

Die Sequenzierungen wurden mit spezifischen oder Standard-Oligonukleotiden unter den vom Hersteller des jeweiligen Gerätes angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die zu

sequenzierende DNA aus Plasmid-Maxi-Isolationen (siehe 2.9.2) wurde hierzu lediglich in Wasser aufgenommen.

2.14 Hybridisierungstechniken

2.14.1 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente wurde unter Verwendung des „Prime-It II Random Primer Labeling Kit“ (Stratagene #300385) durchgeführt.

Zur Markierung wurden 25-50 ng DNA-Fragment sowie 50 μCi [α - ^{32}P]dCTP in einem den Herstellerangaben entsprechenden Reaktionsansatz eingesetzt. Nach der Inkubation der Markierungsreaktion wurden zur Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide 5 μl Glykogen, 0,5 Volumen Ammoniumacetat und 500 μl Ethanol (abs.) zu dem Ansatz gegeben und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (10 min.; 13000 Upm; Heraeus Biofuge 13), mit Ethanol (70%) gewaschen und die Sonde in 100 μl TE aufgenommen. Die Quantifizierung der eingebauten Radioaktivität wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung im Szintillationszähler (Beckmann LS6000SE) bestimmt.

Lösungen :	[α - ^{32}P]dCTP	10 mCi/ml	- Amersham #PB10205
	Glykogen	2 mg/ml	- Roche #901393
	Ammoniumacetat	3 M	
	70% Ethanol		
	Ethanol abs.		
	TE	10 mM Tris/HCl	
		1 mM EDTA	
		pH 8,0	

2.14.2 Filterhybridisierung von DNA

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Methode ist eine Modifikation der Verfahren nach SOUTHERN, E.M. 1975 und CHURCH, G.M. UND GILBERT, W. 1984.

Die zu analysierende DNA wurde zunächst bei 37°C über Nacht restriktionsenzymatisch gespalten (siehe 2.1) und auf einem Agarosegel (siehe 2.5) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel dokumentiert, für 15 min. in HCl geschwenkt, um die DNA in leichter transferierbare Fragmente zu spalten und kurz in Wasser gespült. Danach wurde das Gel 20 min. in Denaturierungslösung inkubiert und schließlich die DNA durch folgenden, von unten nach oben beschriebenen, Aufbau auf eine Nylonmembran (Genescreen; DuPont #NEF-972) übertragen: Glasplatte; drei Whatman-Filter, Agarosegel mit der Oberseite nach unten, Nylonmembran, wieder drei Whatman-Filter, auf Gelgröße gefaltete Zellstoff-Lagen, Glasplatte und ein beschwerendes Gewicht von ca. 500 g. Die Whatman-Filter und die Nylonmembran wurden zuvor in Denaturierungslösung äquilibriert. Der alkalische Kapillartransfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Im Anschluß wurde die

Membran in 50 mM Na₂HPO₄; pH 7,2 für 20 min. neutralisiert, zur Fixierung der DNA 30 min. bei 80°C in einem Ofen gebacken und schließlich mit UV-Licht bestrahlt („Auto-Crosslink“-Modus; Stratalinker; Stratagene). Ihrer Größe entsprechend wurde die Membran mit 5-10 ml CHURCH-Puffer (Hybridisierungslösung) in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 30 min. in einem Wasserbad bei 65°C prähybridisiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde durch Zugabe von 5 µl NaOH denaturiert und es wurde frische Hybridisierungslösung mit 2x10⁶ cpm/ml der markierten Sonde zu dem Filter gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in einem Wasserbad unter leichtem Schütteln. Im Anschluß wurde die Membran zur Entfernung der nicht- oder unspezifisch gebundenen Sonde mit Waschpuffer nach folgendem Schema behandelt :

5 min.; 0,25 l Waschpuffer; Raumtemperatur

2 x 20 min ; 0,5 l Waschpuffer; 65°C

1 h; 0,5 l Waschpuffer; 65°C

Um ein Austrocknen zu verhindern wurde die feuchte Membran erneut in eine Plastikfolie eingeschweißt und auf einer Bildplatte (BAS-IIIIs; Fuji) bei Raumtemperatur exponiert. Anschließend erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines computergestützten Lesegerätes (Fujix Bas 1000 Imagereader; Fuji).

Lösungen :	HCl	0,25 M
	Denaturierungslösung	1,5 M NaCl
		0,5 M NaOH
	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	50 mM, pH 7,2
	CHURCH-Puffer	250 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, pH 7,2
		7% (w/v) SDS
		1 mM EDTA, pH 8,0
	NaOH	2 N
	Waschpuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, pH 7,2
		0,5% (w/v) SDS

2.15 „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Die im folgenden beschriebene Methode ermöglicht es, mRNA-Transkripte im gesamten Embryo („Whole mount“) durch Hybridisierung mit einer markierten Antisense-RNA nachzuweisen. Die markierte Sonde kann mittels spezifischer enzymgekoppelter Antikörper nach Umsetzung eines Farbsubstrates detektiert werden.

Probe	Linearisierung für Antisense-RNA	RNA-Polymerase für Antisense-RNA	Referenz / Quelle
<i>Bmp4</i>	<i>EcoRI</i>	Sp6	Hogan, B.
<i>dHAND</i>	<i>EcoRI</i>	T7	Olson, E.N.
<i>Dkk1</i>	<i>SalI</i>	T7	Niehrs, C.
<i>Hoxd-13</i>	<i>PvuII</i>	T7	Duboule, D.

<i>Fgf-8</i>	<i>Pst</i> I	T7	Martin, G.R.
<i>GDF-5</i>	<i>Spe</i> I	T7	Grotewold, L.
<i>Gli1</i>	<i>EcoRV</i>	T3	Büscher, D.
<i>Lmx1b</i>	<i>Hind</i> III	T3	Johnson, R.
<i>Msx2</i>	<i>Hind</i> III	T7	Robert, B.
<i>Noggin</i>	<i>Not</i> I	T7	Harland, R.
<i>Pax1</i>	<i>Xba</i> I	T3	Imai, K.
<i>Ptc</i>	<i>Nco</i> I	Sp6	Büscher, D.
<i>Shh</i>	<i>Hind</i> III	T3	McMahon, A.P.
<i>Sox9</i>	<i>EcoRV</i>	T3	Lovell-Badge, R.

2.15.1 Synthese der Antisense-RNA-Sonde

In einem 20 µl-Ansatz wurde ca. 1 µg des linearisierten Plasmids mit 2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche #1465384), 2 µl 10x DIG-Nukleotidmix (Roche #1277073), 1 µl RNase Block (40U), 2 µl RNA-Polymerase (T3 - Roche #1031163; T7 – Roche #881767) und DEPC-H₂O vermischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden zur Fällung der *in vitro* transkribierten RNA 2 µl EDTA, 2,5 µl LiCl und 75 µl Ethanol (abs.) hinzugegeben und nach Durchmischung für 30 min. bei –20°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min.; 13200 Upm; 4°C; Heraeus Biofuge 13) wurde der Niederschlag zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und nach kurzer Lufttrocknung in 60 µl 50% Formamid aufgenommen. Ein Aliquot der Probe wurde gelelektrophoretisch (siehe 2.5) überprüft und der Rest bei –20°C gelagert.

Lösungen : DEPC-H₂O H₂O
+0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonate (DEPC) - Sigma #
über Nacht inkubiert; autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.
EDTA 0,5 M, pH 8,0
LiCl 4 M
Ethanol abs
70% Ethanol
50% Formamid 50% (v/v) Formamid
50% (v/v) DEPC-H₂O

2.15.2 Vorbehandlung und Hybridisierung

Die Embryonen des zu analysierenden Entwicklungsstadiums wurden nach der Präparation über Nacht bei 4°C in Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden sie für jeweils 15 min. zweimal in PBT, zweimal in 50 % Methanol und zweimal in Methanol inkubiert.

Danach konnten die Embryonen bei -20°C gelagert werden oder für die „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung eingesetzt werden.

Hierzu wurden die Embryonen zunächst durch Inkubation in 75 %, 50 %, 25 % Methanol für jeweils 10 min. rehydriert und in PBT gewaschen. Danach wurden die Embryonen bei Bedarf in H_2O_2 gebleicht und in PBT gewaschen oder je nach Alter der Embryonen mit Proteinase K behandelt. Im Anschluß an die Proteinase K-Behandlung erfolgte für 5 min. die Inkubation in Glycin, um die Proteinase K zu inaktivieren. Nach dem darauf folgenden Waschschrift in PBT (5 min.) wurden die Embryonen auf Eis in PFA/Glutaraldehyd für 20 min. postfixiert. Nach kurzem Waschen in PBT erfolgte die Prähybridisierung in Hybridisierungsmix für 3 h bei 65°C . Hiernach wurde die Prähybridisierungslösung durch die RNA-Sonde (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Hybmix ersetzt und über Nacht bei 65°C inkubiert.

Lösungen :	Paraformaldehyd	4% (w/v)	
	PBT	PBS	
		+ 1% (v/v) Tween 20	
	25% Methanol	25% (v/v) Methanol	
		in PBT	
	50% Methanol	50% (v/v) Methanol	
		in PBT	
	75% Methanol	75% (v/v) Methanol	
		in PBT	
	H_2O_2	6% (v/v) H_2O_2	
		in PBT	
	Proteinase K	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
		in PBT	
	Glycin	2 mg/ml	
		in PBT	
	PFA/Glutaraldehyd	4% (w/v) PFA	
		0,1% (v/v) Glutaraldehyd	
	Hybridisierungs-		
	mix	50% Formamid	
		5x SSC, pH 4,5	
		0,1% (v/v) Triton X-100	
		50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Heparin	- Sigma #H9399
		0,5 mg/ml tRNA	- Roche #109525
		5 mM EDTA, pH 8,0	
		in DEPC- H_2O	

2.15.3 Entfernung unspezifisch gebundener Sonde und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierung wurden die Embryonen mit vorgewärmten Lösungen für zweimal 30 min. mit Hybridisierungsmix, zweimal 30 min. mit Lösung I, einmal 20 min. mit Lösung I/MABT bei 65°C und schließlich für zweimal 10 min. mit MABT bei Raumtemperatur gewaschen.

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen wurden die Embryonen in Blocklösung überführt und 3-4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die

Blocklösung durch den AP-gekoppelten anti-DIG Antikörper (Roche #1093274; 1:1000 Verdünnung in Blocklösung) ersetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Lösungen :	Hybridisierungs-		
	mix	50% Formamid	
		5x SSC, pH 4,5	
		0,1% (v/v) Triton X-100	
		50 µg/ml Heparin	- Sigma #H9399
		0,5 mg/ml tRNA	- Roche #109525
		5 mM EDTA, pH 8,0	
		in DEPC-H ₂ O	
	Lösung I	50% Formamid	
		1x SSC, pH 4,5	
		0,1% (v/v) Triton X-100	
		in DEPC-H ₂ O	
	Lösung I/MABT	50% (v/v) Lösung I	
		50% (v/v) MABT	
	MABT	100 mM Maleinsäure, pH 7,5	
		150 mM NaCl	
		0,1% (v/v) Triton X-100	
	Blocklösung	2% (w/v) Blockierreagenz	- Roche #1096176
		20% Schafserum –hitzeinaktiviert-	- Sigma #
		in MABT	

2.15.4 Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper und Histochemie

Die Embryonen wurden 6-8x für je 1 h bei Raumtemperatur und schließlich über Nacht bei 4°C in MABT inkubiert. Danach folgte zweimaliges Waschen mit NTMT für jeweils 30 min. und schließlich die Inkubation in Färbelösung im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach Abschluß der Farbreaktion wurden die Embryonen mehrmals in PBT gewaschen, in Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bei 4°C gelagert.

Lösungen :	MABT	100 mM Maleinsäure, pH 7,5	
		150 mM NaCl	
		0,1% (v/v) Triton X-100	
	NTMT	100 mM NaCl	
		100 mM Tris/HCl, pH 9,5	
		50 mM Mg Cl ₂	
		0,5% (v/v) Tween-20	
		0,2 mg/ml Levamisol	- Sigma #L9756
	Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP	- Roche #1681451
		in NTMT	
	PBT	PBS	
		+ 1% (v/v) Tween 20	
	Paraformaldehyd	4% (w/v)	

2.15.5 Modifizierte Prozedur für *in situ* Hybridisierung auf Paraffindünnschnitten

Die hier eingesetzte Methode ermöglicht den Nachweis der mRNA-Transkripte in einzelnen Geweben und Organen auf Paraffindünnschnitte. Hierzu wurden zunächst die Paraffindünnschnitte wie unter 2.18.1 beschrieben hergestellt. Nach Entfernung des Paraffins durch die Inkubation der Präparate in:

Xylol	3x 7 min.
Xylol/Ethanol	2 min.
Ethanol abs.	2x 2 min.
96% Ethanol	1 min.
90% Ethanol	1 min.
70% Ethanol	1 min.
50% Ethanol	1 min.
PBS	2 min.

wurde nach dem von MOORMAN, A.F.M. ET AL. 2001 beschriebenen Protokoll verfahren. Nach der Farbreaktion wurden die Präparate zunächst durch die Inkubation in:

H ₂ O bidest.	2x 10 sec.
50% Ethanol	10 sec.
70% Ethanol	10 sec.
90% Ethanol	10 sec.
96% Ethanol	10 sec.
Ethanol abs.	2x 10 sec.
Xylol/Ethanol	1 min.
Xylol	3x 5 min.

entwässert und anschließend eingedeckelt. Hierzu wurden die einzelnen Objektträger aus dem Xylol genommen, mit Entellan-Eindeckelmedium versehen und mit einem zuvor in Xylol geschwenkten Deckgläschen bedeckt. Zum Trocknen wurden sie dann auf einen ebenen Untergrund gelegt.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
		16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
		150 mM NaCl
		pH 7,3
		autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.
	Xylol/Ethanol	50% (v/v) Ethanol abs.
		50% (v/v) Xylol
	Entellan	- Merck #1.07961.0500

2.16 „Whole mount“ Immunohistochemie

Der Nachweis der Expression der zu untersuchenden Proteine erfolgte unter Verwendung der spezifischen monoklonalen Antikörper bzw. der polyklonalen Antiseren.

Name	Antigen	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Referenz	Quelle
4C7	Hnf3β	1:25	Kanninchen-anti-Maus-IgG-HRP	Jessel, T.M.	(1)
2H3	Neurofilament 165kDa	1:100	Kanninchen-anti-Maus-IgG-HRP	Jessel, T.M.	(1)

Developmental Studies Hybridoma Bank – University of Iowa

Hierzu wurde eine Kombination der Protokolle von DENT, J.A. ET AL., 1989, LEMOTTE, P.K. ET AL., 1989 und des unter folgendem URL : <http://www.mshri.on.ca/nagy/Protocols/wmimmun.htm> erhältlichen Protokolles benutzt. Alle Inkubationen wurden, soweit nicht anders erwähnt, unter leichtem Schütteln in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Embryonen des erforderlichen Entwicklungsstadiums wurden nach Präparation in Paraformaldehyd (PFA) über Nacht bei 4°C fixiert. In einer aufsteigenden Methanol-Reihe (PBS, 50%, 100%) wurden sie jeweils 20 min. dehydriert und entweder bei –20°C gelagert oder zum Bleichen und zur Blockade endogener Peroxidasen in Methanol : DMSO : 30% H₂O₂ (4:1:1) für mindestens 5 h inkubiert. Danach wurden die Embryonen durch 50% Methanol (20 min.), PBS (zweimal 15 min.) und eiskaltes PBSMT (zweimal 15 min., einmal 2 h) rehydriert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper in PBSMT bei 4°C über Nacht. Nach zweimaligem Waschen für je 15 min. und fünfmaligem Waschen für je 1 h in eiskaltem PBSMT erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in PBSMT bei 4°C über Nacht. Auf die sich anschließenden Waschschrte wie nach der ersten Antikörperinkubation folgte eine fünfzehnminütige Inkubation in PBT. Die Farbreaktion wurde in 3,3'-Diaminobenzidine/Urea/H₂O₂ (SigmaFast TabletSet) ausgeführt und in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop überprüft. Nach der Farbentwicklung (5-15 min.) wurden die Embryonen in PBT/Formamid überführt. Nach Erreichen des gewünschten Grades an Transparenz wurden die Embryonen in PFA überführt und bei 4°C gelagert.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
		16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
		150 mM NaCl
		pH 7,3
		autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.
	Paraformaldehyd	4% (w/v)
	50% Methanol	50% (v/v) Methanol
		50% (v/v) PBS
	100% Methanol	
	PBSMT	PBS
		+ 2% (w/v) Magermilchpulver

	+ 0,5% (v/v) Triton X-100
PBT	PBS
	+ 1% (v/v) Tween 20
PBT/Formamid	50% (v/v) PBT
	50% (v/v) Formamid

2.17 Knochen-Knorpel-Färbung

Zur differentiellen Anfärbung der Knochen und des Knorpels in adulten Extremitäten oder ganzen Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (E 14.5-18.5) sowie von Neugeborenen wurde die Methode von C. ARNOTT verwendet.

Die Embryonen bzw. die Extremitäten adulter Tiere wurden nach der Präparation für mindestens 24 h in 80% Ethanol fixiert, sorgfältig gehäutet und die Embryonen bzw. Neugeborenen ausgeweidet. Danach erfolgte die Dehydrierung, zunächst für 24 h in 96% Ethanol und anschließend für 1-3 Tage in Aceton. Die Färbung erfolgte für 6 h bei 37°C unter leichtem Schütteln in Färbelösung. Zur Sichtbarmachung der blaugefärbten knorpeligen und der rotgefärbten verknöcherten Strukturen wurden die Präparate zunächst für eine Stunde in 96% Ethanol und anschließend bis die Skelettstrukturen vollständig sichtbar waren in 1% KOH inkubiert. Darauf folgte eine aufsteigende Glycerin-Reihe (20%, 50% und 80%; jeweils 1-2 Tage) und die Lagerung in 100% Glycerin.

Lösungen :	saurer Alkohol	Ethanol abs.	
		+ 1% (v/v) Essigsäure konz.	
	Alizarin Red S	0,1% (w/v) Alizarin Red S in 95% Ethanol	- Sigma #A5533
	Alcian Blue 8GX	0,3% (w/v) Alcian Blue in 95% Ethanol	- Sigma #A5268
	Färbelösung	98 ml saurer Alkohol	
		+ 1 ml 0,1% (w/v) Alizarin Red S	
		+ 1 ml 0,3% (w/v) Alcian Blue	
	Glycerin-Reihe	20%, 50%, 80% (v/v) Glycerin in 1% KOH	

2.18 Histologische Techniken

2.18.1 Paraffindünnschnitte

Es wurden in der Regel 14 µm dünne Gewebeschnitte von ganzen Embryonen bzw. einzelnen Geweben und Organen verschiedener Entwicklungsstadien nach Fixierung in Paraformaldehyd (PFA) hergestellt. Hierzu wurden die Präparate zunächst durch Inkubation in dem 50-fachen Volumen von 70%, 80%, 90%, 96% und 100% Ethanol für jeweils 2 h unter leichtem Schütteln entwässert. Danach wurden sie in 1-Butanol überführt, über Nacht inkubiert und nach mindestens 4 h in flüssigem Paraplast (Sherwood Medical Co., #8889-502005) schließlich für 2 h unter Vakuum inkubiert. Nach Ausrichtung,

Einbettung und Aushärtung der Präparate über Nacht wurden die Dünnschnitte an einem Microtom (Leica RM 2035) hergestellt.

Nach Streckung der Schnitte im Wasserbad (45°C; GFL 1052) wurden diese auf Objektträger gezogen, für 30-60 min. bei 45°C (Streckbank; OMNILAB Jürgens) inkubiert, über Nacht bei 37°C vollständig getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

2.18.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Zur Hämatoxylin/Eosin-Übersichtsfärbung wurden die zu färbenden Paraffindünnschnitte in Glasgondeln gestellt und durchliefen folgende Inkubationsschritte :

Xylol	3x 7 min.
Xylol/Ethanol	2 min.
Ethanol abs.	2x 2 min.
96% Ethanol	1 min.
90% Ethanol	1 min.
70% Ethanol	1 min.
50% Ethanol	1 min.
H ₂ O bidest.	2 min.
Hämalaun	1,5 min.
H ₂ O	10 min.
H ₂ O bidest.	10 sec.
Eosin	30 sec.
H ₂ O bidest.	10 sec.
50% Ethanol	10 sec.
70% Ethanol	10 sec.
90% Ethanol	10 sec.
96% Ethanol	10 sec.
Ethanol abs.	2x 10 sec.
Xylol/Ethanol	1 min.
Xylol	3x 5 min.

Zum Eindeckeln wurden die einzelnen Objektträger aus dem Xylol genommen, mit Entellan-Eindeckelmedium versehen und mit einem zuvor in Xylol geschwenkten Deckgläschen bedeckt. Zum Trocknen wurden sie dann auf einen ebenen Untergrund gelegt. Nach der Hämatoxylin/Eosin-Färbung erschienen die basophilen Zell- und Gewebeanteile der Präparate blau-violett und die azidophilen Bestandteile rosa-rot.

Lösungen :	Xylol/Ethanol	50% (v/v) Ethanol abs.	
		50% (v/v) Xylol	
	Hämalaun	MAYER, Mayers Hämalaun Lösung (1:4)	- Merck #1.09249.2500
	Eosin	96% (v/v) Ethanol	

	2% (w/v) Eosin G	- Merck #1.15935.0100
	1% (v/v) Essigsäure	
	nach dem Lösen filtriert	
Entellan		- Merck #1.07961.0500

2.18.3 Vibratomschnitte

Es wurden in der Regel 75-100 µm dicke Gewebeschnitte von ganzen Embryonen bzw. einzelnen Geweben und Organen verschiedener Entwicklungsstadien nach „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung oder Immunohistochemie hergestellt. Hierzu wurden die gefärbten Präparate zunächst in 2% Agarose ausgerichtet, eingebettet und nach Aushärtung wurden die Schnitte unter PBS an einem Vibratom (Leica VT1000S) hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und sofort fotografiert.

Lösungen :	Agarose	2% (w/v) in Wasser	- Applichem #A1152
	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	
		16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	
		150 mM NaCl	
		pH 7,3	
		autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	

2.19 Nachweis des programmierten Zelltods (Apoptose)

Die Grundlage für den hier eingesetzten Nachweis des programmierten Zelltods ist die Sichtbarmachung der DNA-Fragmentierung im Zellkern und apoptotischen Körperchen durch die TUNEL-Methode (GAVRIELI, Y. ET AL. 1992). Hierbei werden chemisch modifizierte Nukleotide durch das Enzym terminale Transferase auf die freien 3'-OH-Gruppen der DNA-Einzel- und -Doppelstrangbrüche übertragen, die während des programmierten Zelltods vermehrt entstehen. Diese Nukleotide können anschließend mittels spezifischer enzymgekoppelter Antikörper nach Umsetzung eines Farbsubstrates detektiert werden und ermöglichen die Identifikation der apoptotischen Zellen.

2.19.1 Apoptose-Detektion auf Paraffindünnschnitten

In der vorliegenden Arbeit wurde der „APOPDTECT Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit“ (Q-BIOgene #APOD7401) eingesetzt. Die Präparate wurden hierzu zunächst folgendermaßen behandelt :

Xylol	3x 7 min.
Xylol/Ethanol	2 min.
Ethanol abs.	2x 2 min.
96% Ethanol	1 min.
90% Ethanol	1 min.

70% Ethanol	1 min.
50% Ethanol	1 min.
PBS	5 min.

Danach wurde weiter nach den Angaben des Herstellers verfahren und nach der Farbentwicklung im Peroxidase-Substrat und der Gegenfärbung mit Methylgrün durchliefen die Schnitte folgende Inkubationsschritte :

50% Ethanol	10 sec.
70% Ethanol	10 sec.
90% Ethanol	10 sec.
96% Ethanol	10 sec.
Ethanol abs.	2x 10 sec.
Xylol/Ethanol	1 min.
Xylol	3x 5 min.

Abschließend wurden die einzelnen Objektträger aus dem Xylol genommen, mit Entellan-Eindeckelmedium betropft und mit einem zuvor in Xylol geschwenkten Deckgläschen bedeckt. Zum Trocknen wurden sie auf einen ebenen Untergrund gelegt.

Lösungen :	PBS	4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	Methylgrün	0,5% (w/v) in 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0	– Sigma #M5015
	Xylol/Ethanol	50% (v/v) Ethanol abs. 50% (v/v) Xylol	
	Entellan		- Merck #1.07961.0500

2.19.2 „Whole mount“ Apoptose-Detektion

Die im folgenden beschriebene Methode ermöglicht es, apoptotische Zellen im gesamten Embryo bzw. in einzelnen Organsystemen („Whole mount“) nachzuweisen. Das eingesetzte Protokoll ist ein Modifikation des unter folgendem URL : <http://www.mshri.on.ca/develop/rossant/Protocols/WHOLEMOUNTTUNEL-1.pdf> erhältlichen Protokolles.

Nach der Präparation wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C in Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden sie für jeweils 10 min. zweimal in PBT, zweimal in 50 % Methanol und zweimal in Methanol inkubiert. Zur Detektion der apoptotischen Zellen im Embryo wurden diese zunächst in Methanol/ H_2O_2 für 2-4 h gebleicht und in 75 %, 50 %, 25 % Methanol (jeweils 10 min.) rehydriert. Anschließend wurden die Embryonen mehrmals in PBT gewaschen, für 3 min. mit Proteinase K behandelt und diese durch zweimalige Inkubation in PBT inaktiviert. Danach erfolgte die Postfixierung in

PFA/Glutaraldehyd für 20 min. bei Raumtemperatur und die Zugabe von Natriumborohydrid. Nach dreimaligem Waschen in PBT (jeweils 20 min.) wurden die Embryonen in Äquilibrationpuffer („APODETECT Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit“; Q-BIOgene #APOD7401) überführt und schließlich für 2 h bei 37°C zusammen mit dem TdT Enzym („APODETECT Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit“; Q-BIOgene #APOD7401) inkubiert. Hiernach wurde 3-5x mit PBT gewaschen und während des letzten Waschschriffs für 20 min. auf 70°C erhitzt. Die Embryonen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocklösung gegeben und anschließend zusammen mit dem präabsorbierten AP-gekoppelten Anti-DIG-Antikörper (Roche #1093274; 1:5000 Verdünnung in Blocklösung) über Nacht inkubiert. Danach wurden sie 3x für je 10 min. und 6-8x für je 1 h bei Raumtemperatur und schließlich über Nacht bei 4°C in PBT/Levamisol gewaschen. Schließlich folgte zweimaliges Inkubieren in NTMT für jeweils 20 min. und schließlich wurden die Embryonen in Färbelösung überführt. Nach Abschluß der Farbreaktion wurden die Embryonen mehrmals in PBT gewaschen, in Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bei 4°C gelagert.

Lösungen :	Paraformaldehyd	4% (w/v)	
	PBT	PBS	
		+ 1% (v/v) Tween 20	
	25% Methanol	25% (v/v) Methanol	
		in PBT	
	50% Methanol	50% (v/v) Methanol	
		in PBT	
	75% Methanol	75% (v/v) Methanol	
		in PBT	
	Methanol/H ₂ O ₂	Methanol:30% H ₂ O ₂	
		5:1	
	Proteinase K	5 µg/ml	
		in PBT	
	Natriumborohydrid	0,1% (w/v)	- Fluka #71320
	PFA/Glutaraldehyd	4% (w/v) PFA	
		0,2% (v/v) Glutaraldehyd	
	Blocklösung	0,5% (w/v) Blockierreagenz	- Roche #1096176
		2 mM Levamisol	- Sigma #L9756
		in PBT	
	PBT/Levamisol	2 mM Levamisol	- Sigma #L9756
		in PBT	
	NTMT	100 mM NaCl	
		100 mM Tris/HCl, pH 9,5	
		50 mM Mg Cl ₂	
		0,5% (v/v) Tween-20	
		0,2 mg/ml Levamisol	- Sigma #L9756
	Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP	- Roche #1681451
		in NTMT	

2.20 Zellkulturtechniken

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kulturgefäßen der Firmen Falcon, Nunc und TPP in einem begasten Brutschrank (Heraeus HeraCell; 7,5% (v/v) CO₂) bei 37°C. Die Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilwerkbank (Heraeus HeraSafe 12) durchgeführt.

2.20.1 Zelllinien

2.20.1.1 MEF (embryonale Mausfibroblasten)

Embryonale Mausfibroblasten (MEF – Mouse Embryonic Fibroblast) wurden verwendet, um eine spontane Differenzierung von kultivierten embryonalen Stammzellen der Maus (ES-Zellen) zu verhindern. Bei diesen MEF-Zellen handelt es sich um fibroblastenartige primäre Zellen, die nur eine begrenzte wachstumsfördernde Aktivität und Lebensdauer besitzen. Diese Eigenschaften erforderten eine erneute Isolierung dieser Zellen in regelmäßigen Abständen bzw. die Verwendung von jungen Kulturen.

Gewinnung von embryonalen Mausfibroblasten :

Die Gewinnung von MEF-Zellen erfolgte aus Mäuseembryonen am Tag 12,5 der Embryogenese. Hierzu wurde ein transgenes Männchen der Linie Tg8H, das homozygot das Neomycin-Resistenzgen unter Kontrolle des *TK*-Promoters trägt, mit Wildtyp-Weibchen des Stammes NMRI verpaart. Die Embryonen wurden, nach Entnahme des Uterus, unter der Sterilwerkbank vorsichtig in PBS isoliert.

Danach wurden die Embryonen mehrmals in PBS geschwenkt und mit einer sterilen Pinzette und Schere in kleine Stücke zerkleinert. Diese wurden in einen sterilen 250ml-Erlenmeyerkolben überführt, der bereits zwei Lagen steriler Glasperlen (Ø 2,85-3,3mm; Roth #A557.1) und einen magnetischen Rührstab enthielt. Nach Zugabe von 10 ml Trypsin/EDTA und einigen Tropfen DNase I-Lösung wurde unter leichtem Rühren für 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden weitere 10 ml Trypsin/EDTA zugegeben und erneut für 30 min. bei 37°C leicht gerührt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt.

Nach der letzten Inkubation wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit MEF-Medium auf 50 ml aufgefüllt, zentrifugiert (7 min.; 800 Upm; Heraeus Megafuge 1.0) und das Zellzentrifugat in 50 ml MEF-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in 150 mm Zellkulturschalen überführt (2,5 Embryonen pro Schale). Nach 24 h wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht und nach Erreichen der Konfluenz, in der Regel nach weiteren 24 h, erfolgte die erste Passage der embryonalen Mausfibroblasten. Hierbei wurde jede Platte auf fünf neue Platten aufgeteilt

und weiter inkubiert. Nach einer weiteren Passage wurden alle Zellen vereinigt und für ihre spätere Verwendung in Aliquots eingefroren (eine Schale pro Aliquot).

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	Trypsin/EDTA		– GibcoBRL #45300-027
	DNase I	10 mg/ml	– Roche #1284932
	MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Foetales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.;56°C)	– GibcoBRL #41965-039 – GibcoBRL #14140-114 – GibcoBRL #15140-114 – Biochrom KG #S0115 Charge 244S

Herstellung von Nährzellen aus embryonalen Mausfibroblasten :

Die Kokultivierung von MEF-Zellen und ES-Zellen erforderte die Herstellung von mitotisch inaktiven Nährzellen. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Behandlung der MEF-Zellen mit Mitomycin C, das Verknüpfungen zwischen der DNA hervorruft und somit die Zellproliferation verhindert, erreicht.

Es wurde ein Aliquot der embryonalen Mausfibroblasten aufgetaut, auf drei 150 mm Zellkulturschalen verteilt und unter normalen Kulturbedingungen bis zum Erreichen der Konfluenz inkubiert. Hiernach konnten die Zellen ein weiteres Mal 1:3 bis 1:5 passagiert werden oder direkt für die Herstellung der Nährzellen verwendet werden. Hierzu wurde das zur Kultivierung verwendete MEF-Medium mit Mitomycin C versetzt (final 10 µg/ml) und die Zellen für 2,5 – 3 h unter normalen Kulturbedingungen weiter inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal gründlich mit PBS gespült, trypsiniert, in MEF-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden anschließend nach Bedarf mit einer Dichte von 2,5 x 10⁴ Zellen/cm² in die unterschiedlichen Kulturgefäße ausgesät, in der Regel über Nacht kultiviert und vor der Kokultur mit den embryonalen Stammzellen der Maus gründlich mit PBS gespült.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Foetales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.;56°C)	– GibcoBRL #41965-039 – GibcoBRL #14140-114 – GibcoBRL #15140-114 – Biochrom KG #S0115 Charge 244S
	Mitomycin C	1 mg/ml	– Sigma #M-0503

2.20.1.2 ES 14-1 (embryonale Stammzellen der Maus)

Für die Mutagenese-Ansätze in embryonalen Stammzellen der Maus wurde in der vorliegenden Arbeit die ES-Zelllinie ES 14-1 (KÜHN, R. ET AL. 1991) verwendet, die eine Sublinie der ES-Zelllinie ES 14 (HOOPER, M. ET AL. 1987) darstellt. Um eine spontane Differenzierung der pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus zu verhindern, erfolgte die Kultivierung auf einer Schicht von Nährzellen aus MEF-Zellen (siehe 2.20.1.1). Zusätzlich wurde die Kultivierung in ES-Medium durchgeführt, das bei Bedarf durch ESGRO™ (final 10^3 U/ml; leukemia inhibitory factor) supplementiert wurde, was ebenfalls der Differenzierung entgegenwirken sollte.

Lösungen :	ES-Medium	500 ml DMEM	- GibcoBRL #41965-039
		+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml)	- GibcoBRL #14140-114
		+ 5 ml L-Glutamin (200 mM)	- GibcoBRL #15140-114
		+ 600 µl β-Mercaptoethanol (100 mM)	- Sigma #M7522
		+ 75 ml Foetales Kälberserum (FCS)	- Biochrom KG #S0115
		(Hitze-inaktiviert 30 min.; 56°C)	Charge 244S
	ESGRO™	10^7 U/ml	- Chemicon #ESG1107

2.20.2 Passagieren von Zellen

MEF-Zellen :

Die Zellen wurden durch Trypsin/EDTA-Behandlung passagiert; hierzu wurde nach Erreichen der Konfluenz das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und in Abhängigkeit von der Größe des Kulturgefäßes mit 0,5 - 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min. im Brutschrank inkubiert. Die vom Gefäßboden abgelösten Zellen wurden durch gründliches Resuspendieren in frischem MEF-Medium vereinzelt und eine entsprechende Zellzahl oder Verdünnung wurde in neue Kulturgefäße ausgesät.

Lösungen :	PBS	4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	Trypsin/EDTA		- GibcoBRL #45300-027
	MEF-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 50 ml Foetales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.; 56°C)	- GibcoBRL #41965-039 - GibcoBRL #14140-114 - GibcoBRL #15140-114 - Biochrom KG #S0115 Charge 244S

ES-Zellen :

Die Passage der ES-Zellen erfolgte nicht unter dem Gesichtspunkt der Konfluenz, sondern die Erhaltung eines undifferenzierten Zustandes war entscheidend; als Hauptkriterium diente hierbei die Morphologie der einzelnen Kolonien einer Kultur. Die einzelnen Kolonien durften nicht zu dicht wachsen, nicht zu groß werden und sie durften nicht ihre

charakteristische Morphologie verlieren, so daß eine Passage in der Regel jeden zweiten Tag erforderlich war.

Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gespült und wie bereits beschrieben trypsiniert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in frischem ES-Medium gründlich resuspendiert, um die Zellaggregate vollständig aufzulösen. Die Zellen wurden in neue Kulturgefäße ausgesät, in denen zuvor mitomycinbehandelte MEF-Zellen in der erforderlichen Dichte ausgesät und kultiviert worden waren (siehe 2.20.1.1). Die ES-Zellen mußten in der Regel 1:5 oder 1:10 verdünnt werden, wenn sie in Kulturgefäße der selben Größe umgesetzt wurden. Bei Größenzunahme des Kulturgefäßes wurde die Zellsuspension vollständig oder 1:2 verdünnt auf die MEF-Zellen gegeben.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	Trypsin/EDTA		– GibcoBRL #45300-027
	ES-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 600 µl β-Mercaptoethanol (100 mM) + 75 ml Foetales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.; 56°C)	– GibcoBRL #41965-039 – GibcoBRL #14140-114 – GibcoBRL #15140-114 – Sigma #M7522 – Biochrom KG #S0115 Charge 244S
	ESGRO™	10 ⁷ U/ml	– Chemicon #ESG1107

2.20.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte durch einfaches Auszählen der Zellen in einer NEUBAUER-Zählkammer. Hierfür wurden die Zellen gründlich resuspendiert und ihre Anzahl innerhalb der 8 Großquadrate der Zählkammer bestimmt; aus diesem Wert wurde mit Hilfe der folgenden Formel die Zellzahl berechnet :

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times 10^4$$

2.20.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie bereits beschrieben trypsiniert und in Medium resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde in Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (7 min.; 800 Upm; Heraeus Megafuge 1.0), das überstehende Medium abgesaugt, die Zellen zügig in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und die Zellen in ein Kryo-Röhrchen (Nunc #375353) überführt. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und bis zu sechs Monate gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen nach 1-3 Tagen bei -80°C in flüssigen Stickstoff transferiert.

Für die Elektroporation wurden 25 µg DNA der Mutagenese-Konstrukte und 5 µg DNA der Ausgangsvektoren eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Kapazität von 500 µF und einer Spannung von 220 V (Biorad; Gene Pulser). Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 10 min. bei Raumtemperatur in den Elektroporationsküvetten belassen, anschließend in 10 ml (pos. und neg. Kontrolle) bzw. 50 ml (Mutagenesevektor) nichtselektives ES-Medium überführt und vorsichtig resuspendiert. Schließlich wurden jeweils 5×10^5 Zellen in eine 10cm-Kulturschale mit mitomycinbehandelten MEF-Zellen ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert.

Lösungen :	PBS	4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mM NaCl pH 7,3 autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
	Trypsin/EDTA		– GibcoBRL #45300-027
	ES-Medium	500 ml DMEM + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml) + 5 ml L-Glutamin (200 mM) + 600 µl β-Mercaptoethanol (100 mM) + 75 ml Foetales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.; 56°C)	– GibcoBRL #41965-039 – GibcoBRL #14140-114 – GibcoBRL #15140-114 – Sigma #M7522 – Biochrom KG #S0115 Charge 244S

Selektion, Isolierung und Vermehrung von ES-Zellen

Nach zwei bzw. fünf Tagen wurde das nichtselektive ES-Medium gegen selektives ES-Medium (ES-Medium + 350 µg/ml G418 bzw. ES-Medium + 0,2 µM Ganciclovir) ausgetauscht. Das Medium wurde in der Regel jeden zweiten Tag gewechselt bis keine toten Zellen im Überstand mehr zu sehen waren und die resistenten Kolonien auszuwachsen begannen. Nach neun Tagen waren die resistenten Klone soweit herangewachsen, daß sie mit einer feinen Glaskapillare von den MEF-Zellen abgelöst und als individueller Klon isoliert werden konnten.

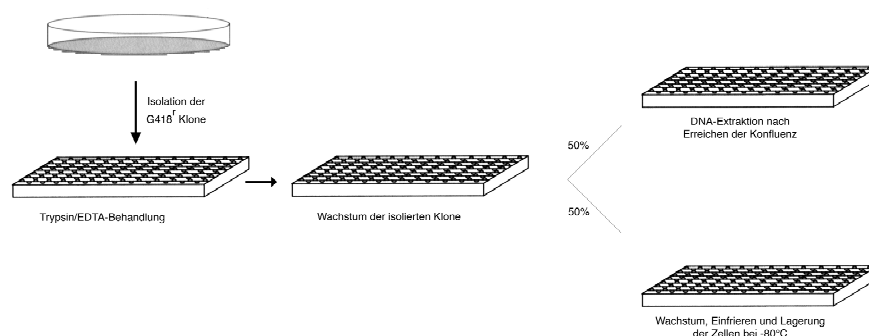


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Isolierung und Vermehrung der selektionierten ES-Zellen (modifiziert nach RAMÍRES-SOLIS, R. ET AL. 1992)

Die einzelnen Klone wurden in 50 µl Trypsin/EDTA inkubiert und nach der Zugabe von 100 µl selektivem ES-Medium gründlich resuspendiert. Danach wurde diese Zellsuspension vollständig in 96-Loch-Zellkulturgefäße mit mitomycinbehandelten MEF-Zellen ausgesät und kultiviert (siehe 2.20.1.1). Nach Erreichen einer gewissen Dichte und Koloniegröße wurden alle Zellen auf der 96-Loch Platte mit PBS gewaschen und trypsinisiert (siehe 2.20.2). Mit einer 12-Kanal-Pipette wurden die Zellen 1:2 auf ein 96-Loch-Zellkulturgefäß mit mitomycinbehandelten MEF-Zellen (siehe 20.1.1) und auf ein mit Gelatine beschichtetes 96-Loch-Zellkulturgefäß verteilt. Die auf MEF-Zellen wachsenden ES-Zellen wurden nach Erreichen der erforderlichen Koloniegröße und -dichte nach untenstehendem Protokoll eingefroren, wohingegen die auf Gelatine kultivierten Zellen im Zustand der Konfluenz für die DNA Mikroextraktion aus 96-Loch Platten eingesetzt wurden (siehe 2.10.2).

Lösungen :	G418	Geneticin-Sulfat	- GibcoBRL #11811-031
	Ganciclovir	Ganciclovir-Natrium; Cymeven i.v.	- Roche
	Trypsin/EDTA		- GibcoBRL #45300-027
	Gelatine	0,2% (w/v) in H ₂ O	- Sigma #G1890
	ES-Medium	500 ml DMEM	- GibcoBRL #41965-039
		+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (10 ³ U/ml)	- GibcoBRL #14140-114
		+ 5 ml L-Glutamin (200 mM)	- GibcoBRL #15140-114
		+ 600 µl β-Mercaptoethanol (100 mM)	- Sigma #M7522
		+ 75 ml Foetales Kälberserum (FCS) (Hitze-inaktiviert 30 min.; 56°C)	- Biochrom KG #S0115 Charge 244S

Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen auf 96-Loch Platten

Die Zellen wurden 4 h vor dem Einfrieren mit frischem ES-Medium versorgt, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit 50 µl Trypsin/EDTA für 10 min. im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 50 µl 2x Einfriermedium hinzugegeben und sorgfältig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit sterilem Paraffinöl überschichtet und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Zum Auftauen und der anschließenden Vermehrung der als homolog rekombinant identifizierten ES-Zellklone wurde die 96-Loch Platte aus dem -80°C-Tiefkühlschrank direkt in den Brutschrank überführt und für 10-15 min. inkubiert. Nach dem Auftauen der Zellsuspensionen wurden die benötigten Klone vorsichtig in eine 24-Loch Platte mit mitomycinbehandelten MEF-Zellen (siehe 2.20.1.1) gegeben. Nach Kultivierung über Nacht wurde das Medium durch frisches ES-Medium ersetzt und die ES-Zellklone unter Standardbedingungen weiter kultiviert.

Lösungen :	PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
		16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
		150 mM NaCl
		pH 7,3
		autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.

Trypsin/EDTA		– GibcoBRL #45300-027
ES-Medium	500 ml DMEM	– GibcoBRL #41965-039
	+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml)	– GibcoBRL #14140-114
	+ 5 ml L-Glutamin (200 mM)	– GibcoBRL #15140-114
	+ 600 µl β -Mercaptoethanol (100 mM)	– Sigma #M7522
	+ 75 ml Foetales Kälberserum (FCS)	– Biochrom KG #S0115
	(Hitze-inaktiviert 30 min.; 56°C)	Charge 244S
2x Einfriermedium	60% (v/v) ES-Medium	
	20% (v/v) Foetales Kälberserum (FCS)	– Biochrom KG #S0115
	(Hitze-inaktiviert 30 min.; 56°C)	Charge 244S
	20 % (v/v) DMSO	– Merck #1.02950.0500
Paraffinöl	dünflüssig, steril	– Apotheke d. MHH

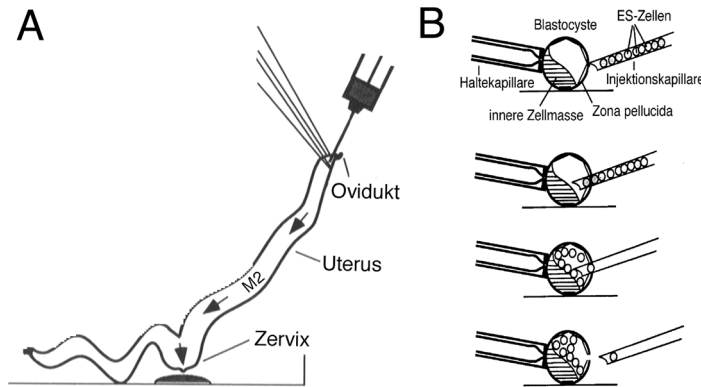
2.21 Tierexperimentelle Verfahren

2.21.1 Erzeugung von ES-Zell Chimären

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Einem chimäre Mäuse durch Blastozysten-Injektion erzeugt; dies geschah in Kooperation mit dem Institut für Genetik (AG Rajewsky), Universität zu Köln. Zum Anderen wurde versucht chimäre Mäuse sowohl durch Injektion von homolog rekombinanten genetisch veränderten ES-Zellklonen in Blastozysten als auch durch Aggregation dieser mit Embryonen des Morulastadiums zu erzeugen. Als Spendertiere wurden Mäuse des Stammes C57Bl/6 verwendet. Als Ammentiere dienten C3H x C57Bl/6 F1 Weibchen, die mit vasktomisierten Männchen verpaart wurden, um eine Scheinschwangerschaft hervorzurufen.

2.21.1.1 Blastozysten-Injektion

Zur Erzeugung von ES-Zell Chimären mittels Blastozysten-Injektion wurden die allgemeinen Standardmethoden eingesetzt (Übersicht bei HOGAN, B. ET AL. 1994; JOYNER, A.L. 1999). Die Spendertiere wurden nach erfolgreicher Anpaarung am Tag (E) 3,5 der Embryonalentwicklung durch Strecken getötet. Die isolierten Uteri wurden in M2-Medium gelagert und die enthaltenen Embryonen mit M2-Medium (Sigma #M7167) ausgespült (ca. 300 µl/Uterus), indem unmittelbar unterhalb des Ovidukts mit einer Kanüle der Uterus penetriert und die Embryonen mit der Flüssigkeit ausgespült wurden. Danach wurden die Blastozysten mit einer feinen Glaskapillare eingesammelt, durch Überführen in mehrere Tropfen M2-Medium gewaschen und schließlich bis zur Injektion in M16-Medium (Sigma #M7292) unter Öl (Merck #1.7161.0500) gelagert. Die Injektion erfolgte mit einer üblichen Mikromanipulator-Injektionsmikroskop-Kombination. Hierzu wurden die Blastozysten und die ES-Zellen in einen Injektionsobjektträger mit M2-Medium und Öl gegeben. Es wurden jeweils 10-12 ES-Zellen in eine Blastocyste eingebracht und die Embryonen anschließend in M16-Medium unter Öl bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Transfer (siehe 2.21.1.3) inkubiert (Übersicht bei HOGAN, B. ET AL. 1994; TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997; JOYNER, A.L. 1999).



und die ES-Zellen auf der inneren Zellmasse der Blastozyste abgelegt. (modifiziert nach TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997)

2.21.1.2 Embryo (Morula)-Aggregation

Zur Erzeugung von ES-Zell Chimären wurde die Methode der Kokultivierung von homolog rekonbinanten ES-Zellen mit Embryonen des 8-Zell- oder Morulastadiums eingesetzt. Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll von TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997.

Die Spendertiere wurden nach erfolgreicher Anpaarung am Tag (E) 2,5 der Embryonalentwicklung durch Strecken getötet. Die Uteri wurden entnommen und in M2-Medium gelagert. Anschließend konnten die Embryonen mit M2-Medium ausgespült (300 µl/Uterus) werden, indem mit einer feinen Kanüle (Hamilton #90033) vom Infundibulum aus ein Flüssigkeitsstrom durch den Uterus erzeugt wurde. Danach wurden die 8-Zell- und Morulastadien mit einer feinen Glaskapillare eingesammelt, durch Überführen in mehrere Tropfen M2-Medium gewaschen und schließlich bis zu weiteren Verwendung in M16-Medium unter Öl gelagert.

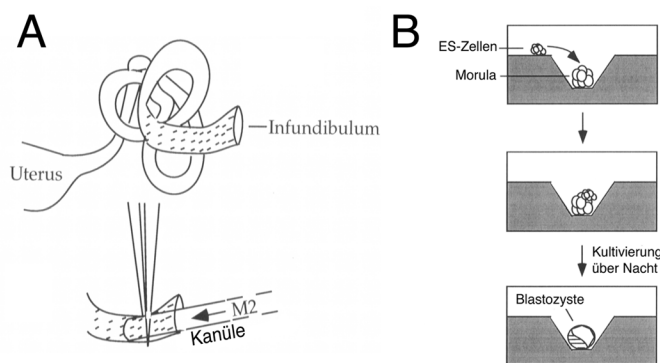


Abbildung 2.4: Morula-Aggregation.

(A) Schematische Darstellung des Ausspülens der 8-Zell- und Morulastadien aus dem Uterus. (B) Schematische Darstellung einer typischen Anordnung zur Aggregation eines 8-Zell- bzw. Morulastadium-Embryos mit einem durch kontrollierte Trypsin/EDTA-Behandlung erzeugten Klumpen von ES-Zellen. Die erforderlichen Vertiefungen konnten

unter leichtem Druck mit einer Stopfnadel in den verwendeten Zellkulturschalen erzeugt werden. (modifiziert nach TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997).

Bevor eine Kokultivierung der Embryonen mit den ES-Zellen erfolgen konnte, mußte die Zona pellucida entfernt werden. Hierzu wurden die Embryonen für 5 min. bei 37°C in Protease (Sigma #P8811; 0,5% (w/v) in M2-Medium) inkubiert, durch 2 Tropfen M2- und durch einen Tropfen M16-Medium gewaschen. Schließlich wurden die Embryonen in die sog. Aggregationsplatte, die eine Vielzahl von kleinen Vertiefungen zur Aufnahme jeweils eines Embryos hat, gegeben und es wurden die durch kontrollierte unvollständige Trypsin/EDTA-Behandlung erzeugten ES-Zellklumpen von je 5-10 Zellen zu den Embryonen gegeben. Nach dem Zusammenbringen von Embryo und ES-Zellen erfolgte die Kultivierung im Brutschrank über Nacht (37°C; 7,5% (v/v) CO₂). Am nächsten Tag wurden die Blastozysten in die Ammentiere übertragen (siehe 2.21.1.3).

2.21.1.3 Blastozysten-Transfer

Die Ammentiere für die injizierten bzw. nach Embryo-Aggregation erhaltenen Blastozysten wurden am Tag (E) 2,5 der Schwangerschaft verwendet. Nach Anästhesie mit Xylazin/Ketamin durch intraperitoneale Injektion wurden unter Anwendung allgemein etablierter Techniken (Übersicht bei HOGAN, B. ET AL. 1994; JOYNER, A.L. 1999) bis zu 10 Blastozysten pro Uterushorn übertragen. Nach der Wundversorgung wurden die Mäuse in ihren Käfig zurückgegeben, zur Minimierung des Wärmeverlustes während der Narkose mit Zellstoff und Käfigeinstreu bedeckt und im Verlauf der Schwangerschaft beobachtet. Die geborenen Jungtiere wurden auf ihre Fellfarbe hin untersucht. Schwarze Jungtiere wurden als Wildtyp aussortiert. Die gemischtfarbigen Jungtiere wurden als genetisch veränderte Tiere (Chimäre) in die Zucht aufgenommen, um zu überprüfen inwieweit die homolog rekombinanten ES-Zellen zur Bildung der Keimbahnzellen beigetragen haben und ob die genetischen Veränderungen an die Nachkommen weitergeben werden (Übersicht bei HOGAN, B. ET AL. 1994; JOYNER, A.L. 1999).

2.21.2 Tierhaltung

Die Tierhaltung und –zucht erfolgte in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

2.21.3 Isolierung definierter Embryonalstadien

Die Mäuse wurden paarweise in einen Käfig gesetzt und am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen Vaginapfropf hin untersucht. 12 Uhr mittags des Tages des Vaginalpfropfes wurde als Tag (E) 0,5 der Embryonalentwicklung definiert.

Nach Erreichen des gewünschten Alters wurden die Muttertiere durch Strecken getötet, die Uteri präpariert und die Embryonen und die embryonalen Membranen in PBS unter dem Stereomikroskop isoliert.

Lösungen : PBS 4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 16 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 150 mM NaCl
 pH 7,3
 autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.

2.21.4 Identifikation genetisch veränderter Tiere und Embryonen

Zusätzlich zur phänotypischen Identifikation der verwendeten genetisch veränderten Tiere bzw. Embryonen wurde eine PCR-basierende Genotypisierung vorgenommen, um zwischen Wildtypen und hetero-, bzw. homozygoten Merkmalsträgern zu unterscheiden. Hierzu wurde entweder aus Schwanzbiopsien oder aus embryonalen Membranen isolierte genomische DNA (siehe 2.10.1) in den diagnostischen PCR-Amplifikationen (siehe 2.12.2) oder Filterhybridisierungen (siehe 2.14.2) verwendet.

2.22 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe einer digitalen Kamera (Fuji HC-300Z) auf einem Zeiss „StemiSV11“ Stereomikroskop bzw. einem Zeiss Axioplan-Mikroskop. Die anschließende Bildverarbeitung erfolgte mit Photoshop 6.0 auf einem PowerMac G4.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion der Mutagenese-Vektoren

Die Konstruktion der einzelnen Mutagenese-Vektoren erforderte zunächst einige vorausgehende Analysen, die für die nachfolgenden Klonierungsexperimente, vor allem aber für die gezielte Mutagenese des *Gli3*-Gens von zentraler Bedeutung waren.

3.1.1 Isolierung genomischer Fragmente

Zu Beginn dieser Arbeit lag bereits ein großes genomisches Fragment des Maus *Gli3*-Gens in Form eines BAC („bacterial artificial chromosome“)-Klons (#46H4) vor, das durch Filterhybridisierung einer Maus ES-129/SvJ-Bibliothek (Incyte #FBAC-4432) mit einer *Gli3* spezifischen Sonde erhalten worden war. Dieses Fragment enthält die Zink-Finger Region, den gesamten distalen Bereich und einen Teil des proximalen Bereich des *Gli3*-Gens. Es erstreckt sich über ungefähr 200 kb genomischer Sequenzen und wurde unter Berücksichtigung der vorausgegangenen Analysen (BÖSE, J. 1997) verwendet, um eine Mini-Bibliothek kleiner genomischer Fragmente zu erzeugen. Aus dieser Mini-Bibliothek konnte durch Größenvergleich, PCR-Analyse und Filterhybridisierung ein Klon isoliert werden, der, flankiert durch die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI, 18 kb genomischer *Gli3*-Sequenzen enthielt. Dieses Fragment wurde für die weiteren Analysen verwendet und konnte zur Konstruktion der Mutagenesevektoren eingesetzt werden, da der benötigte Bereich des *Gli3*-Gens in diesem Fragment enthalten ist. Ferner handelt es sich hierbei, im Vergleich zu den im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten ES-Zellen, um isogene DNA, deren Verwendung eine Voraussetzung für die erfolgreich ablaufende homologe Rekombination in ES-Zellen ist (siehe 1.3.1).

3.1.2 Partielle Restriktionskartierung des *Gli3*-Lokus

Unter Verwendung des zuvor isolierten genomischen *Gli3*-Fragments konnte durch wiederholte Spaltung der DNA mit einzelnen und Kombinationen verschiedener Restriktionsendonukleasen eine grobe Kartierung vorgenommen werden (Abb. 3.1). Es wurden hierbei besonders Restriktionsendonukleasen verwendet, deren Erkennungssequenzen auch in der *Gli3* cDNA (THIEN, H. ET AL. 1996) zu finden waren. Diese Restriktionskartierung war notwendig und ausreichend für die nachfolgende Isolierung weiterer kleinerer genomischer Fragmente des *Gli3*-Gens und die Bestimmung der Intron-

Exon-Struktur im distalen Bereich des Gens. Die weitergehende Analyse der 3' der Zink-Finger gelegenen Region war erforderlich, da hier die gezielte Manipulation durch homologe Rekombination in ES-Zellen durchgeführt werden sollte, um die im Menschen gefundenen *GLI3*-Mutationen in das Genom der Maus einzubringen.

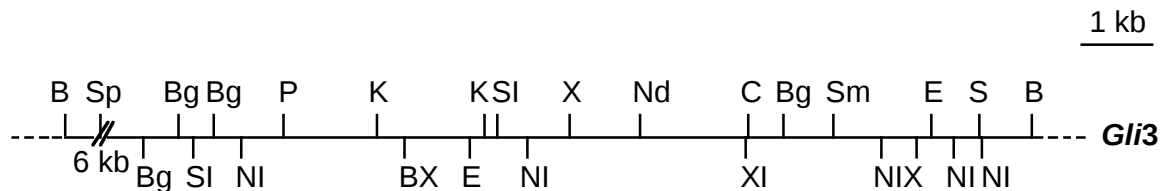


Abbildung 3.1: Partielle Restriktionskartierung des *Gli3* Gens unter Verwendung des genomischen 18kb Klon aus BAC 46H4. B – *Bam*HI; Bg – *Bgl*II; BX – *Bst*XI; C – *Cla*I; E – *Eco*RV; K – *Kpn*I; NI – *Nco*I; Nd – *Nde*I; P – *Pac*I; S – *Sac*II; SI – *Sac*I; Sm – *Sma*I; Sp – *Spe*I; X – *Xba*I; XI – *Xho*I

3.1.3 Intron-Exon-Struktur des Maus *Gli3*-Gen

Einzelne kleinerer genomische Fragmente des *Gli3*-Gens, die aus dem 18 kb DNA-Fragment (siehe 3.1.1) isoliert worden sind, und dieses 18kb DNA-Fragment wurden zur DNA-Sequenzierung verwendet (siehe 2.13). Die erhaltenen Sequenzinformationen konnten zur Bestimmung der Intron-Exon-Struktur des *Gli3*-Gens genutzt werden. Hieraus ergab sich, daß sich ein Teil der Zink-Finger Region (Zink-Finger III-V) und die für die gezielte Mutagenese des *Gli3*-Gens relevante Region distal der Zink-Finger über einen Bereich von 11,5 kb genomischer Sequenz erstreckt und auf 4 Exons aufgeteilt ist (Abb. 3.2). Die Zusammenfassung der Analyse ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Exon	Position (bp)	Aminosäure
n-3	1819-1981	549-603
n-2	1982-2270	604-699
n-1	2271-2603	700-810
n	2604-5563	811-1596

Tabelle 2: Intron-Exon-Struktur des *Gli3*-Gens. Die Nummerierung der gefundenen Exons ist ausgehend vom letzten Exon, in dem sich das Stop-Codon befindet. Die Positionsangaben beziehen sich auf die cDNA-Sequenz nach THIEN, H. ET AL. 1996.



Abbildung 3.2: Intron-Exon-Struktur des *Gli3*-Gens. Die schwarzen Boxen repräsentieren die einzelnen Exons. Die Nummerierung erfolgte entsprechend der Tabelle 2.

Außerdem zeigte sich durch vergleichende Analyse mit der für *GLI3* beschriebenen Intron-Exon-Struktur (KANG, S. ET AL. 1997; WILD, A. ET AL. 1997) eine Übereinstimmung der Aufteilung der kodierenden Sequenz auf die einzelnen Exons und deren Größe sowie des relativen Abstands zwischen den einzelnen Exons.

3.1.4 Sequenzvergleich zwischen dem humanen *GLI3* und murinen *Gli3*

Das beabsichtigte Einbringen der im Menschen identifizierten *GLI3*-Mutationen (C-terminal der Zink-Finger Region; PHS - KANG, S. ET AL. 1997; PAP-A - RADHAKRISHNA, U. ET AL. 1997B) und einer intermediär gelegenen Mutation (Position 2402) durch homologe Rekombination in das *Gli3*-Gen der Maus erforderte zunächst die Übertragung der im Menschen identifizierten Mutationen (PHS – 2023delG; PAP-A – 2358delA) auf die Maussequenz. Hierzu erfolgte ein Vergleich der humanen (NM_000168) und der murinen (NM_008130) *Gli3*-Sequenzen in der relevanten Region distal der Zink-Finger unter Verwendung des Programmes „BLAST 2 sequences“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>; TATUSOVA, T.A. UND MADDEN, T.L. 1999). Hierbei zeigte sich, daß an Position 2194 der Maussequenz ein Guanin und an Position 2463 ein Adenin deletiert werden mußte, um die entsprechenden in PHS- bzw. PAP-A-Patienten gefundenen Veränderungen der mRNA in der Maus nachzustellen.

3.1.5 Herstellung der einzelnen Mutagenese-Vektoren

Die Konstruktion der einzelnen Mutagenese-Vektoren erfolgte unter Einsatz der unter 2.1-2.9 beschriebenen Standardtechniken. Als Ausgangsmaterial diente das zuvor isolierte genomische 18kb große *Gli3*-Fragment, verschiedene handelsübliche Klonierungsvektoren (pBluescript - Stratagene, pSP73 - Promega, pSL1180 - Pharmacia, pGEM-T - Promega) und die die verwendeten Selektionsmarker-Kassetten tragenden Vektoren (pPGKneoNTRtkpA – WU, H. ET AL 1994; pMMneoflox-08 – TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997).

p*Gli3*^{neo/tk}

Durch den Vektor p*Gli3*^{neo/tk} sollte eine Mutation in das *Gli3*-Gen eingebracht werden, die zwischen den beiden für PHS und PAP-A beschriebenen Mutationen lokalisiert ist (siehe 3.1.4). Hierzu sollte die Selektionsmarker-Kassette (*neo/tk*) in das Exon n-1 (siehe 3.1.3) an Position 2402 der kodierenden Sequenz von *Gli3* eingebracht werden. Hierdurch kommt es zu einem Abbruch des Proteins an Aminosäure 744. Zur Konstruktion des Mutagenese-

Vektors sollte die Selektionsmarker-Kassette von Abschnitten der genomischen *Gli3*-Sequenz flankiert werden, die die homologe Rekombination in ES-Zellen vermitteln können und die gezielte Manipulation des *Gli3*-Gens ermöglichen (Abb 3.5). Hierzu wurde zunächst die PGKneoNTRtkpA-Kassette mit dem durch restriktionsenzymatische Spaltung des genomischen 18 kb-Klons mit *Bgl*II und *Cla*I erhaltenen DNA-Fragment (siehe 3.1.1; 3.1.2) kombiniert. Anschließend wurde dieses neu entstandene Fragment mit dem durch *Cla*I und *Sac*II aus dem genomischen *Gli3*-Klon isolierten Fragment verbunden. Der daraus resultierende Mutagenese-Vektor (siehe 3.2.1 und Abb. 3.5) stellt sich somit aus 7,5 kb homologer Sequenz (*Bgl*II;*Cla*I) 5' der PGKneoNTRtkpA-Kassette und 3,5 kb homologer *Gli3*-Sequenz (*Cla*I;*Sac*II) 3' der Selektionsmarker-Kassette dar. Die für die Transfektion der ES-Zellen erforderliche Linearisierung des Mutagenese-Vektors konnte durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *Sal*I erzielt werden.

p*Gli3*^{mPHS}

Durch die Transfektion von ES-Zellen mit dem Vektor p*Gli3*^{mPHS} sollte die Leserastermutation 2194delG in die kodierende Sequenz des *Gli3*-Gens eingebracht werden (siehe 3.1.4). Zusammen mit dieser Minideletion war es erforderlich die Erkennungssequenz für eine diagnostische Restriktionsendonuklease (*Bam*HI) in das Exon n-2 (siehe 3.1.3) einzufügen, um die nachfolgende Analyse der transfizierten ES-Zellen zu ermöglichen. Zunächst wurde ein DNA-Fragment durch Spaltung mit *Nco*I aus dem zuvor isolierten *Bgl*II;*Cla*I Fragment (siehe oben) isoliert. Hieraus wurde ein kleineres Fragment durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RV und *Nco*I isoliert. Dieses Fragment wurde in einem PCR-vermittelten Ansatz eingesetzt, um unter Verwendung der Oligonukleotide mPHS-F1 und mPHS-B1 (siehe 2.12) sowohl die Minideletion als auch die Erkennungssequenz für die diagnostische Restriktionsendonuklease (*Bam*HI) einzufügen. Das nach der PCR-Amplifikation schließlich erhaltene modifizierte *Eco*RV;*Nco*I DNA-Fragment wurde zum Austausch gegen das Wildtyp-Fragment in dem größeren *Nco*I Fragment verwendet. Danach wurde das neu entstandene, die Mutation-tragende Fragment zum Austausch des entsprechenden Wildtyp-Fragments in den durch Spaltung des 18 kb-Klons mit *Bgl*II und *Cla*I erhaltenen Abschnitt des *Gli3*-Gens eingesetzt. Dieser DNA-Abschnitt wurde mit dem durch *Cla*I und *Sac*II aus dem genomischen *Gli3*-Klon isolierten Fragment verbunden und ergab den endgültigen Mutagenese-Vektor (siehe 3.2.2 und Abb. 3.8). Die Analyse des eingebrachten nach PCR-Amplifikation erhaltenen Fragments durch DNA-Sequenzierung ergab, daß sowohl die

Minideletion als auch die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease wie beabsichtigt eingefügt werden konnte (Abb. 3.3)

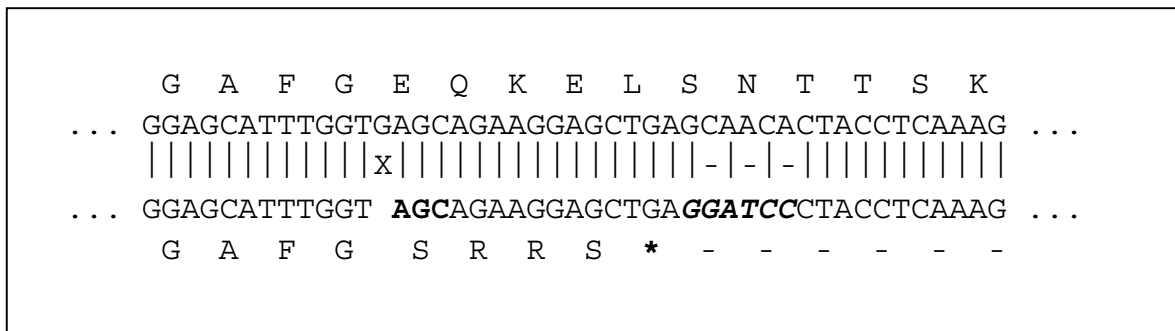


Abbildung 3.3: Vergleich der Sequenzen von Wildtyp-*Gli3* und dem gezielt mutierten *Gli3*, das zur Erzeugung des *Gli3*^{mPHS}-Allels verwendet werden soll. In der oberen Reihe ist die Wildtyp-Sequenz von Position 2182-2227 und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt. Im Vergleich dazu ist in der unteren Reihe die Sequenz des gezielt veränderten *Gli3* und die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt. Im Fettdruck hervorgehoben ist die Leserastermutation 2194delG. Die eingefügte Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *BamHI* ist fett und kursiv dargestellt. Das durch die Mutation entstehende Stop-Codon an Aminosäure-Position 679 ist durch einen Stern (*) markiert.

Der p*Gli3*^{mPHS}-Mutagenese-Vektor (siehe 3.2.2 und Abb. 3.8) setzt sich somit aus insgesamt 11 kb homologer *Gli3*-Sequenzen (*BglII*; *ClaI* und *ClaI*; *SacII*) zusammen, die sowohl durch die eingebrachte Minideletion, als auch die Erkennungssequenz für die diagnostische Restriktionsendonuklease unterbrochen sind. Die für die Transfektion der ES-Zellen erforderliche Linearisierung des Mutagenese-Vektors konnte durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *SalI* vorgenommen werden.

p*Gli3*^{mPAP-A}

Unter Verwendung des Vektors p*Gli3*^{mPAP-A} sollte die Leserastermutation 2463delA in die kodierende Sequenz des *Gli3*-Gens eingebracht werden (siehe 3.1.4). Zusammen mit dieser Minideletion sollte die Erkennungssequenz für eine diagnostische Restriktionsendonuklease (*BamHI*) in das Exon n-1 (siehe 3.1.3) eingefügt werden, um die nachfolgende Analyse der transfizierten ES-Zellen zu ermöglichen. Zunächst wurde ein DNA-Fragment durch Spaltung mit *BglII* und *ClaI* aus dem zuvor isolierten *ClaI*; *SacII* Fragment (siehe oben) isoliert. Dieses Fragment wurde in einem PCR-vermittelten Ansatz eingesetzt, um unter Verwendung der Oligonukleotide mPAP-A-F1 und mPAP-A-B1 (siehe 2.12) sowohl die Minideletion als auch die Erkennungssequenz für die diagnostische Restriktionsendonuklease (*BamHI*) einzufügen. Das schließlich erhaltene modifizierte *BglII*; *ClaI* DNA-Fragment wurde zum Austausch gegen das Wildtyp-Fragment in dem größeren *ClaI*; *SacII* Fragment verwendet. Das neu entstandene, die Mutation tragende



pdGli3^{mPHS-neoflox}

isolierte Selektionsmarker-Kassette. Diese konnte nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit *EcoRV* in das Intron zwischen den Exons n-3 und n-2 des *Gli3*-Gens eingefügt werden. Nach der erfolgreichen homologen Rekombination in den ES-Zellen kann die Kassette durch die transiente Expression der Cre-Rekombinase entfernt werden. Dieses kann entweder direkt in den ES-Zellen oder später in der Mauslinie durchgeführt werden und wird durch die Flankierung der Selektionsmarker-Kassette durch zwei loxP-Sequenzen ermöglicht (Übersicht bei TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997). Der Mutagenese-Vektor (siehe 3.2.3 und Abb. 3.9) setzt sich somit aus den bereits in $pGli3^{mPHS}$ enthaltenen *Gli3*-Sequenzen (*BglII*; *ClaI* und *ClaI*; *SacII*) zusammen, die hier nicht nur durch die eingebrachte Minideletion und die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease unterbrochen werden, sondern zusätzlich noch durch die eingebrachte Selektionsmarker-Kassette. Eine Linearisierung konnte ebenfalls durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *SalI* durchgeführt werden.

$pGli3^{mPAP-A-neoflox}$

Durch Modifikation des Vektors $pGli3^{mPAP-A}$ konnte der Vektor $pGli3^{mPAP-A-neoflox}$ erstellt werden. Nach Transfektion des Vektors und erfolgreicher homologer Rekombination in ES-Zellen befindet sich die Leserastermutation 2463delA sowie die Erkennungssequenz der diagnostischen Restriktionsendonuklease im *Gli3*-Gen (siehe oben). Außerdem kann der Vektor entsprechend dem Vektor $pGli3^{mPHS-neoflox}$ nicht nur im Zusammenhang mit einer „Double Replacement“-Strategie verwendet werden, sondern trägt ebenfalls die Selektionsmarker-Kassette aus pMMneoflox-08, die nach Cre-Expression, vermittelt durch die flankierenden loxP-Sequenzen, aus dem *Gli3*-Lokus entfernt werden kann (Übersicht bei TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997). Die Selektionsmarker-Kassette wurde nach Spaltung des Vektors $pGli3^{mPAP-A}$ mit der Restriktionsendonuklease *BglII* in das Intron zwischen den Exons n-1 und n des *Gli3*-Gens integriert. Der Mutagenese-Vektor (siehe 3.2.4 und Abb. 3.12) setzt sich somit aus den bereits in $pGli3^{mPAP-A}$ enthaltenen *Gli3*-Sequenzen (*BglII*; *ClaI* und *ClaI*; *SacII*) zusammen, die durch die eingebrachte Minideletion und die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease und zusätzlich noch durch die eingebrachte Selektionsmarker-Kassette unterbrochen werden. Eine Linearisierung konnte durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *SalI* durchgeführt werden.

3.2 Stabile Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen und Identifizierung homolog rekombinanter Klone

Nach der Konstruktion der Mutagenesevektoren, die die gezielte Manipulation des *Gli3*-Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus ermöglichen, wurden die einzelnen Vektoren für die Transfektion der ES14-1 Zelllinie verwendet (siehe 2.20.5).

3.2.1 Verwendung des Vektors p*Gli3*^{neo/tk}

Für die Transfektion der embryonalen Stammzellen wurde der Vektor p*Gli3*^{neo/tk} verwendet, der nach homologer Rekombination mit dem *Gli3*-Gen zur Integration der Selektionsmarker-Kassette (*neo/tk*) in das Genom der ES-Zellen führt. Gleichzeitig wurde hierdurch eine Mutation in das *Gli3*-Gen eingeführt, die zu einer Unterbrechung der kodierenden Sequenz an der Position 2402 (Nummerierung nach THIEN, H. ET AL. 1996) und somit zu einem Abbruch des Proteins an Aminosäure 744 führt. Die Einzelheiten der Mutagenese-Strategie sind in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt.

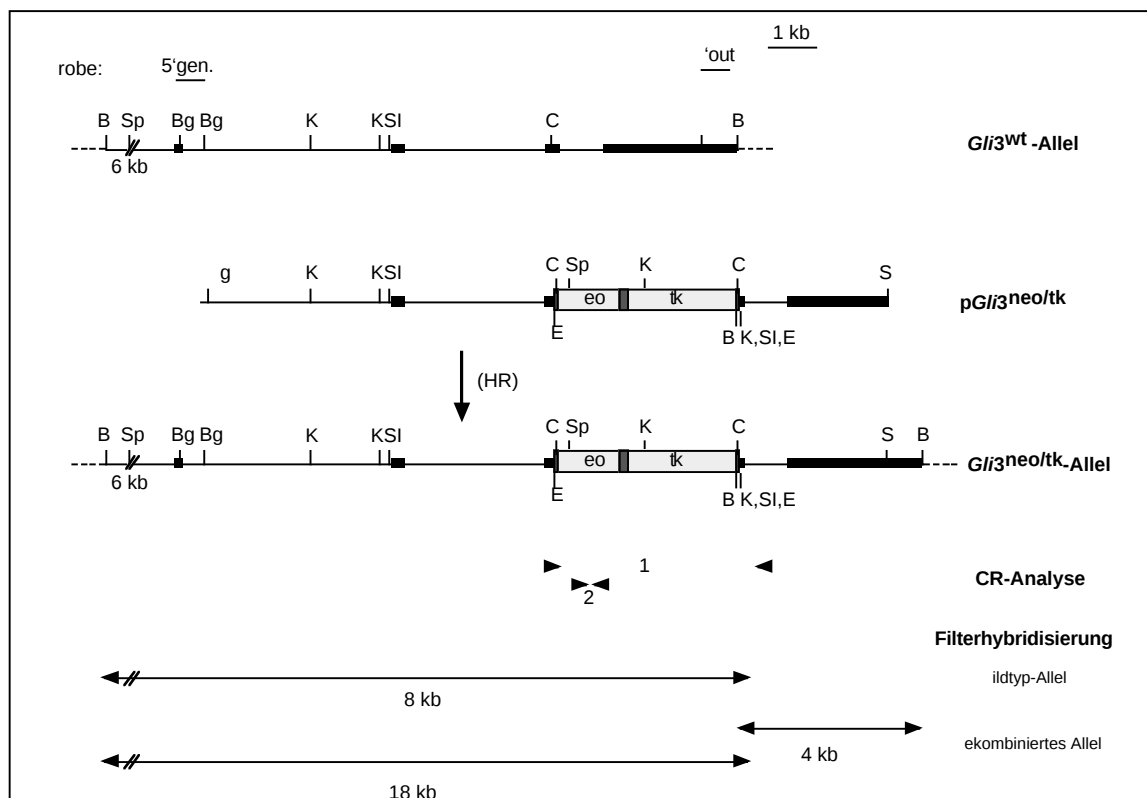


Abbildung 3.5: Darstellung der beabsichtigten Manipulation des *Gli3*-Gens durch homologe Rekombination in ES-Zellen unter Verwendung des Vektors p*Gli3*^{neo/tk}, der Analyse-Strategie zum Nachweis der erfolgreichen Mutagenese und des erwarteten mutierten *Gli3*^{neo/tk}-Allels. Die schwarzen Boxen repräsentieren die identifizierten Exons des *Gli3*-Gens (siehe 3.1.3). Die Abschnitte homologer Sequenzen innerhalb des Mutagenese-Vektors erstrecken sich zwischen den Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bgl*II und *Cla*I bzw. *Cla*I und *Sac*II. Die Pfeilköpfe geben die relative Lage der in Abschnitt 3.5 und 3.7 verwendeten Oligonukleotid-Kombinationen an. 1 – 3'52;Seq-Intron-B1 / 2 – neo-F2;neo-B2 Die Doppelpfeile markieren die Fragmente genomischer DNA und die zugehörigen Fragmentgrößen, die nach Spaltung mit *Bam*HI und Filterhybridisierung mit den angegebenen Proben 5' gen (*Bgl*II-Fragment) und 3' out (*Sac*II;*Bam*HI-Fragment) erhalten werden. Die Abkürzungen der verwendeten Restriktionsendonukleasen entsprechen Abb. 3.1.

Zusätzlich hierzu kann durch die Verwendung und Integration der *neo/tk*-Kassette in das *Gli3*-Gen eine sog „Double replacement“-Strategie angewendet werden. Hierbei besteht die Möglichkeit, nach der Markierung des für die jeweilige Fragestellung interessanten Gens oder einer Region dieses Gens durch einen positiven und negativen Selektionsmarker (*neo* bzw. *tk*) eine vielfache Manipulation durch sequentiell aufeinanderfolgende homologe Rekombinationen durchzuführen. Auf diese Weise können nach der Etablierung der G418-resistenten homolog rekombinanten Klone diese verwendet werden, um nachfolgend mehrere Mutationen in dieselbe oder benachbarte Regionen eines Locus einzubringen. Hierdurch besteht die Möglichkeit schnell und effizient mehrere Mutationen in ein Gen einzubringen und gleichzeitig nach der zweiten homologen Rekombination sämtliche heterologen Sequenzen aus dem endogenen Locus zu entfernen (WU, H. ET AL. 1994). Nach der Transfektion von ES14-1 ES-Zellen mit dem *pGli3^{neo/tk}*-Vektor durch Elektroporation und nachfolgender Selektion der Zellen wurden insgesamt 576 G418-resistente Klone isoliert. Hiervon wurden 276 Klone nach DNA-Mikroextraktion aus 96-Loch-Platten und restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Bam*HI durch Filterhybridisierung (siehe 2.10.2; 2.14) mit der Probe 3'out analysiert (Abb. 3.6).

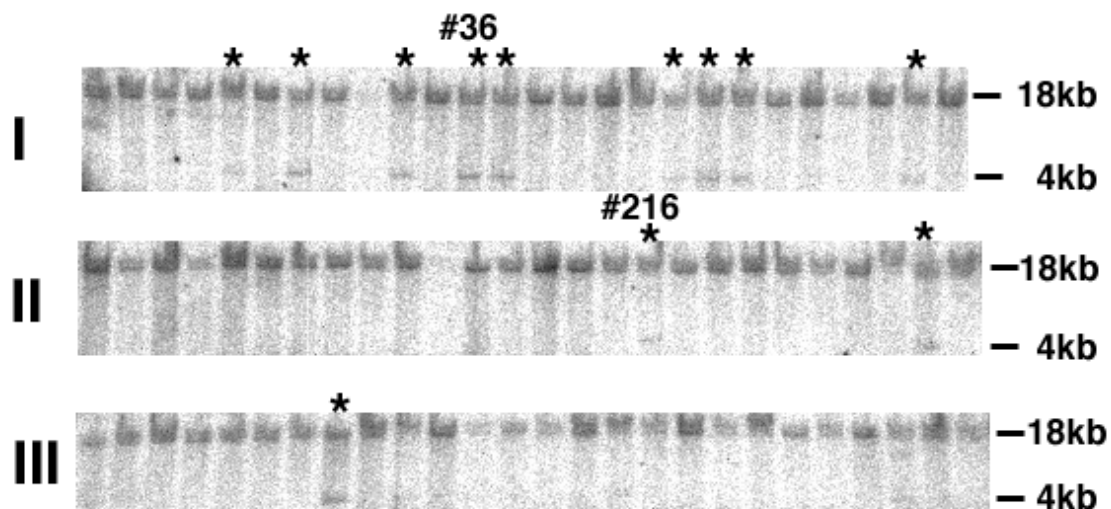


Abbildung 3.6: Identifizierung der homolog rekombinanten *Gli3^{neo/tk}*-ES-Zellklone. Dargestellt ist das Ergebnis einer Filterhybridisierung mit der Probe 3'out nach restriktionsenzymatischer Spaltung der nach Mikroextraktion erhaltenen DNA mit *Bam*HI. In den mit * gekennzeichneten Spuren ist zusätzlich zu dem 18 kb Wildtyp-Fragment ein für die homologe Rekombination indikatives 4 kb DNA-Fragment zu erkennen. Die vierte positive Spur in I repräsentiert Klon #36 und die erste in II den Klon #216.

Unter diesen 276 Klonen konnten 34 (12%) gefunden werden, die einen für eine erfolgreiche homologe Rekombination indikativen Längen-Polymorphismus zeigten. Diese Klone wurden in einem Titrationsversuch verschiedenen Konzentration von Ganciclovir ausgesetzt, um die Funktionstüchtigkeit der Selektionsmarker-Kassette zu überprüfen

(Daten nicht gezeigt). Von diesen 34 homolog rekombinanten Klonen hatten 22 eine funktionsfähige (G418^r/GANC^s) Selektionsmarker-Kassette (siehe unten).

	Anzahl
G418 ^r Klone isoliert	576
Klone analysiert	276
Homolog rekombinante	34 (12,3%)
G418 ^r /GANC ^s Klone	22

Tabelle 3: Zusammenfassung der Transfektion mit dem pGli3^{neo/tk} –Vektor

Von den 22 G418^r/GANC^s Klonen wurden zwei Klone (#36 und #216), die keine Auffälligkeiten in ihrem Wachstumsverhalten zeigten und aufgrund ihrer Morphologie undifferenziert und somit pluripotent erschienen, durch restriktionsenzymatische Spaltung und Filterhybridisierung im Detail untersucht. Hierdurch sollte die erfolgreiche homologe Rekombination erneut überprüft werden und die Integrität des *Gli3*-Lokus im Bereich der eingebrachten Mutation untersucht werden. Ferner sollte auf eine mögliche weitere Integration des Mutagenese-Vektors an einer anderen Stelle des Genoms oder eine Mehrfachintegration in das *Gli3*-Gen untersucht werden (Abb.3.7). Hierbei zeigte sich, daß die beiden analysierten Klone das erwartete Fragment-Muster aufweisen und nur die beabsichtigte Mutation im *Gli3*-Gen tragen.

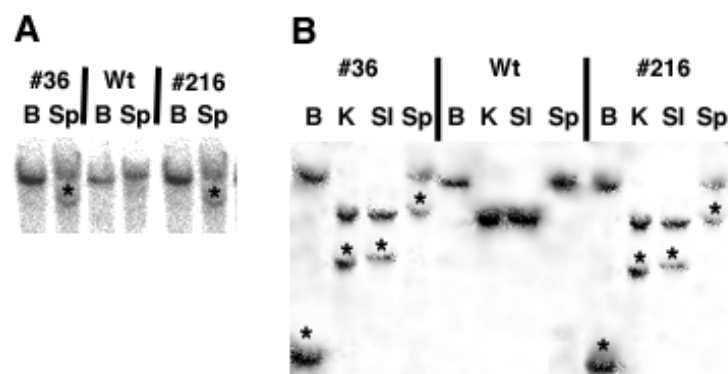


Abbildung 3.7: Charakterisierung der Klone #36 und #216 durch Filterhybridisierung. (A) Filterhybridisierung von genomischer DNA der Klone #36 und #216 sowie von Wildtyp-ES-Zellen nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Bam*HI (B) und *Spe*I (Sp) unter Verwendung der Probe 5'gen. In den beiden untersuchten Klonen zeigt sich zusätzlich zu dem Wildtyp- (22 kb) ein für die homologe Rekombination indikatives (11 kb) Fragment (*) nach Spaltung mit *Spe*I. (B) Filterhybridisierung der DNA-Proben aus (A) nach Spaltung mit *Bam*HI (B), *Kpn*I (K), *Sac*I (SI) und *Spe*I (Sp) und Verwendung der Probe 3'out. In den beiden Klonen kann zusätzlich zu den Wildtyp- (18kb; 11kb; 12kb; 22kb) ein jeweils durch die erfolgreiche homologe Rekombination entstehendes (4kb; 7,5kb; 8,5kb; 15kb) DNA-Fragment nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde eine Filterhybridisierung nach Spaltung mit *Bam*HI und der Verwendung der kodierenden Sequenz des *Neo*-Gens als Probe durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnte nur das erwartete DNA-Fragment nachgewiesen werden, so daß zusammen mit den anderen Filterhybridisierungen aus Abb. 3.7 davon ausgegangen werden kann, daß in den untersuchten Klonen keine Mehrfachintegrationen des Mutagenesevektors vorliegen. Die zwei Klone #36 und #216 wurden für die weitergehenden Experimente verwendet (siehe 3.2.2 und 3.3.1).

3.2.2 Verwendung des Vektors p*Gli3*^{mPHS} und p*Gli3*^{mPAP-A}

Aufgrund der unmittelbaren Nachbarschaft der beiden Mutationen, die in das *Gli3*-Gen eingebracht werden sollten (mPHS - 2194delG und mPAP-A – 2463delA) und der Etablierung der *Gli3*^{neo/tk}-ES-Zelllinie (siehe 3.2.1), die die Selektionsmarker-Kassette an Position 2402 des kodierenden Bereiches von *Gli3* enthält, sollte hier die „Double replacement“-Strategie eingesetzt werden. Die einzelnen Schritte der Manipulation des *Gli3*-Gens sind in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt.

Als ES-Zellen für die stabile Transfektion mit den Vektoren p*Gli3*^{mPHS} und p*Gli3*^{mPAP-A} wurden sowohl der Klon #36 als auch der Klon #216 der *Gli3*^{neo/tk}-ES-Zelllinie (siehe 3.2.1) verwendet. Beide Klone waren entsprechend den Anforderungen der „Double replacement“-Strategie resistent gegenüber G418 und sensitiv gegenüber Ganciclovir. In jeweils zwei unabhängigen Elektroporationen mit jedem der beiden Vektoren konnten einmal nur 284 Klone (mPHS) und einmal 288 Klone (mPAP-A) auf eine erfolgreiche homologe Rekombination untersucht werden. In keinem der untersuchten Ansätze konnte ein homolog rekombinanter Zellklon identifiziert werden. Außerdem waren die nach der Selektionsprozedur (siehe 2.20.5) erhaltenen ES-Zellen in ihrer Morphologie so stark verändert, daß ihr Differenzierungsstatus nicht mehr eingeschätzt werden konnte. Im weiteren Verlauf konnten keine verlässlichen Selektionsbedingungen (Konzentration der Droge, Beginn der Selektion nach der Elektroporation, Dauer der Selektion) etabliert werden, die einen erneuten effizienten Versuch ermöglicht hätten.

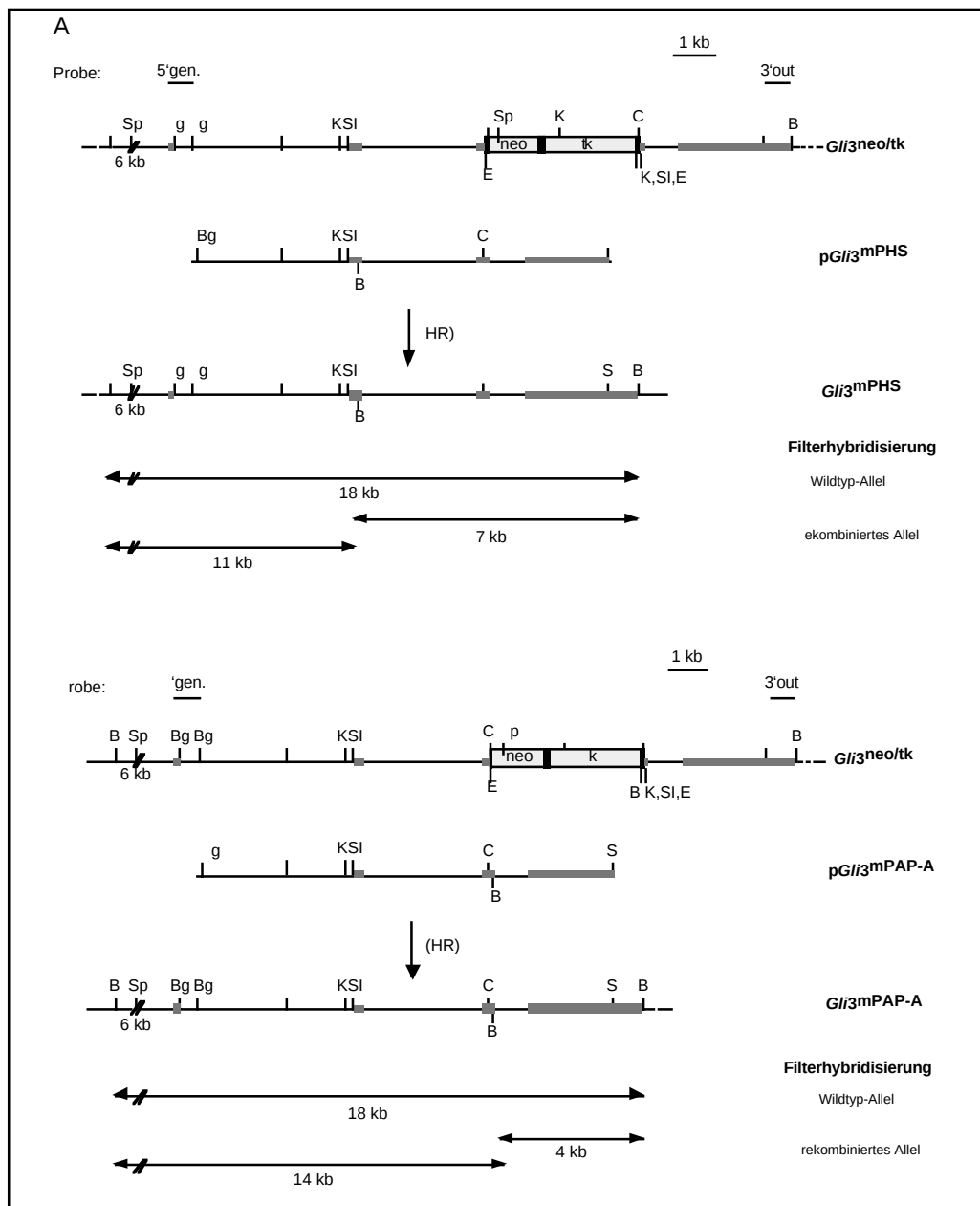


Abbildung 3.8: Manipulation des *Gli3*-Gens durch homologe Rekombination in *Gli3^{neo/tk}*-ES-Zellen unter Verwendung der Vektoren *pGli3^{mPHS}* (A) bzw. *pGli3^{mPAP-A}* (B). Dargestellt ist die Analyse-Strategie zum Nachweis der erfolgreichen Mutagenese und die erwarteten mutierten *Gli3^{mPHS}*- bzw. *Gli3^{mPAP-A}*-Allele. Die schwarzen Boxen repräsentieren die identifizierten Exons des *Gli3*-Gens (siehe 3.1.3). Die Abschnitte homologer Sequenzen innerhalb des Mutagenese-Vektors erstrecken sich zwischen den Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bgl*II und *Sac*II. Unterbrochen werden die homologen Bereiche nur durch die eingebrachten Leseraster-Mutationen (mPHS – 2194 und mPAP-A – 2463; schwarzer *) und die eingebrachten diagnostischen Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen (*Bam*HI). Die Doppelpfeile markieren die Fragmente genomischer DNA und die zugehörigen Fragmentgrößen, die nach Spaltung mit *Bam*HI und Filterhybridisierung mit den angegebenen Proben 5'gen (*Bgl*II-Fragment) und 3'out (*Sac*II;*Bam*HI-Fragment) erhalten werden. Die Abkürzungen der verwendeten Restriktionsendonukleasen entsprechen Abb. 3.1.

3.2.3 Verwendung des Vektors $pGli3^{mPHS-neoflox}$

Die Transfektion der ES-Zellen erfolgte unter Verwendung des Vektors $pGli3^{mPHS-neoflox}$. Nach erfolgreicher homologer Rekombination des Vektors mit dem *Gli3*-Lokus kommt es zur Integration der durch loxP-Erkennungssequenzen flankierten Selektionsmarker-Kassette (*neo*) in ein Intron des *Gli3*-Gens und gleichzeitig wird die Leserastermutation (2194delG) und die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI in die kodierende Sequenz von *Gli3* eingefügt (Nummerierung nach THIEN, H. ET AL. 1996). Hierdurch kommt es zu einem Abbruch des Gli3-Proteins an Aminosäure 675 (+4 nicht-Gli3 Aminosäuren bis zum Stop-Codon). Die Einzelheiten der Mutagenese-Strategie sind in Abbildung 3.9 schematisch dargestellt.

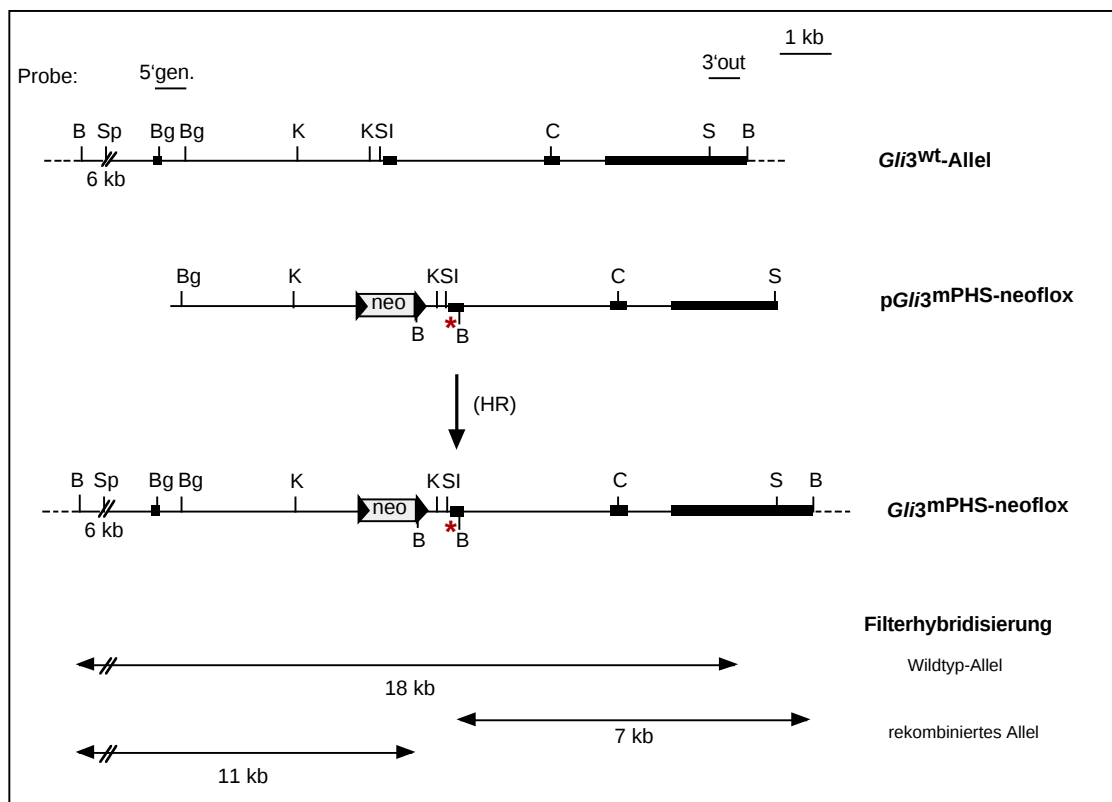


Abbildung 3.9: Darstellung der beabsichtigten Manipulation des *Gli3*-Gens durch homologe Rekombination in ES-Zellen unter Verwendung des Vektors $pGli3^{mPHS-neoflox}$, der Analyse-Strategie zum Nachweis der erfolgreichen Mutagenese und des erwarteten mutierten $Gli3^{mPHS-neoflox}$ -Allels. Die schwarzen Boxen repräsentieren die identifizierten Exons des *Gli3*-Gens (siehe 3.1.3). Die Abschnitte homologer Sequenzen innerhalb des Mutagenese-Vektors erstrecken sich zwischen den Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bgl*II und *Sac*II. Unterbrochen werden die homologen Bereiche nur durch die eingebrachte Leseraster-Mutation (mPHS – 2194delG), die eingebrachten diagnostischen Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen (*Bam*HI) und die Selektionsmarker-Kassette, die von zwei loxP-Erkennungssequenzen (Dreiecke) flankiert wird. Die Doppelpfeile markieren die Fragmente genomischer DNA und die zugehörigen Fragmentgrößen, die nach Spaltung mit *Bam*HI und Filterhybridisierung mit den angegebenen Proben 5'gen (*Bgl*II-

Fragment) und 3'out (*SacII*/*BamHI*-Fragment) erhalten werden. Die Abkürzungen der verwendeten Restriktions-endonukleasen entsprechen Abb. 3.1.

Nach der Transfektion von ES14-1 ES-Zellen mit dem $pGli3^{mPHS-neoflox}$ -Vektor durch Elektroporation und nachfolgender Selektion der Zellen wurden insgesamt 384 G418-resistente Klone isoliert. Diese Klone wurden nach DNA-Mikroextraktion aus 96-Loch-Platten und restriktionsenzymatischer Spaltung mit *BamHI* durch Filterhybridisierung (siehe 2.10.2; 2.14) mit der Probe 3'out analysiert (Abb. 3.10).



Abbildung 3.10: Identifizierung der homolog rekombinanten $Gli3^{mPHS-neoflox}$ -ES-Zellklone. Dargestellt ist das Ergebnis einer Filterhybridisierung mit der Probe 3'out nach restriktionsenzymatischer Spaltung der nach Mikroextraktion erhaltenen DNA mit *BamHI*. In der mit * gekennzeichneten Spuren ist zusätzlich zu dem 18 kb Wildtyp-Fragment ein für die homologe Rekombination indikatives 7 kb großes DNA-Fragment zu erkennen. Bei dem hier identifizierten positiven ES-Zellklon handelt es sich um Klon #3.

Unter diesen 384 Klonen konnten 3 (0,8%) gefunden werden, die einen für eine erfolgreiche homologe Rekombination indikativen Längen-Polymorphismus zeigten.

	Anzahl
G418 ^r Klone isoliert	384
Klone analysiert	384
homolog rekombinante	3 (0,8%)

Tabelle 4: Zusammenfassung der Transfektion mit dem $pGli3^{mPHS-neoflox}$ -Vektor

Diese drei Klone (#3; #80 und #320), die keine Auffälligkeiten in ihrem Wachstumsverhalten zeigten und aufgrund ihrer Morphologie undifferenziert und somit pluripotent erschienen, wurden durch restriktionsenzymatische Spaltung und Filterhybridisierung im Detail untersucht. Hierdurch konnte die erfolgreiche homologe Rekombination ein weiteres Mal überprüft werden und die Integrität des *Gli3*-Lokus im Bereich der eingebrachten Mutation untersucht werden. Außerdem sollte eine mögliche weitere Integration des Mutagenese-Vektors an einer anderen Stelle des Genoms oder eine Mehrfachintegration in das *Gli3*-Gen ausgeschlossen werden (Abb.3.11). Hierbei zeigte sich, daß die analysierten Klone das erwartete Fragment-Muster aufwiesen und nur die beabsichtigte Mutation im *Gli3*-Gen tragen. Außerdem wurde eine Filterhybridisierung nach Spaltung mit *EcoRV* und der Verwendung der kodierenden Sequenz des *Neo*-Gens

als Probe durchgeführt. Hierbei konnte nur das erwartete DNA-Fragment nachgewiesen werden, so daß zusammen mit den anderen Filterhybridisierungen aus Abb. 3.11 davon ausgegangen werden kann, daß in den untersuchten Klonen keine Mehrfachintegrationen des Mutagenesevektors vorliegen (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Experimente wurde der Klon #80 verwendet (siehe 3.3.2).

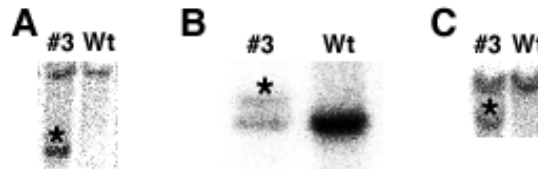


Abbildung 3.11: Die Charakterisierung der Klone #3; #80 und #320 durch Filterhybridisierung ist exemplarisch für den Klon #80 dargestellt.. (A) Filterhybridisierung von genomischer DNA des Klones #80 sowie von Wildtyp-ES-Zellen mit der Probe 5'gen nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Bam*HI (B). In dem untersuchten Klon zeigt sich zusätzlich zu dem Wildtyp- (18 kb) ein für die homologe Rekombination indikatives (11 kb) Fragment (*) nach Spaltung mit *Bam*HI. (B) Filterhybridisierung der DNA-Proben aus (A) nach Spaltung mit *Sac*I (SI) und Hybridisierung mit der Probe 5'gen.. Zusätzlich zu dem Wildtyp- (4,5kb) kann ein durch die erfolgreiche homologe Rekombination entstehendes (5,7kb) DNA-Fragment nachgewiesen werden. (C) Filterhybridisierung der DNA-Proben aus (A) nach Spaltung mit *Bam*HI (B) und Hybridisierung mit der Probe 3'out.. Neben dem Wildtyp- (18kb) kann ein durch die erfolgreiche homologe Rekombination entstehendes (7kb) DNA-Fragment detektiert werden

3.2.4 Verwendung des Vektors p*Gli3*^{mpAP-A-neoflox}

Durch die homologe Rekombination des Vektors p*Gli3*^{mpAP-A-neoflox} mit dem *Gli3*-Lokus nach Transfektion der ES-Zellen kommt es zur Integration der durch loxP-Erkennungssequenzen flankierten Selektionsmarker-Kassette (*neo*) in ein Intron des *Gli3*-Gens und gleichzeitig wird die Leserastermutation (2463delA) und die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI in die kodierende Sequenz von *Gli3* eingefügt (Nummerierung nach THIEN, H. ET AL. 1996). Hierdurch kommt es zu einem Abbruch des Gli3-Proteins an Aminosäure 764 (+16 nicht-Gli3 Aminosäuren bis zum Stop-Codon). Die Einzelheiten der Mutagenese-Strategie sind in Abbildung 3.12 schematisch dargestellt.

Nach der Transfektion von ES14-1 ES-Zellen mit dem p*Gli3*^{mpAP-A-neoflox}-Vektor durch Elektroporation und nachfolgender Selektion der Zellen wurden insgesamt 384 G418-resistente Klone isoliert. Diese wurden nach DNA-Mikroextraktion aus 96-Loch-Platten und restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Bam*HI durch Filterhybridisierung (siehe 2.10.2; 2.14) mit der Probe 3'out analysiert (Abb. 3.13).

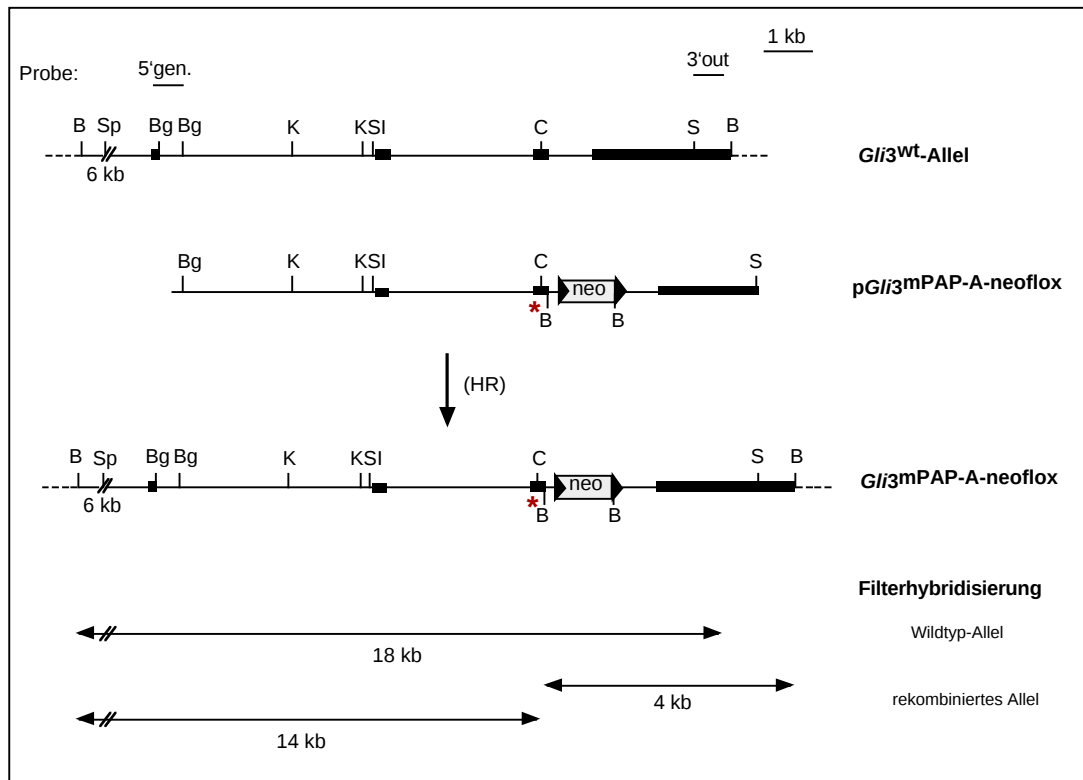


Abbildung 3.12: Darstellung der beabsichtigten Manipulation des *Gli3*-Gens durch homologe Rekombination in ES-Zellen unter Verwendung des Vektors *pGli3^{mPAP-A-neoflox}*, der Analyse-Strategie zum Nachweis der erfolgreichen Mutagenese und des erwarteten mutierten *Gli3^{mPAP-A-neoflox}*-Allels. Die schwarzen Boxen repräsentieren die identifizierten Exons des *Gli3*-Gens (siehe 3.1.3). Die Abschnitte homologer Sequenzen innerhalb des Mutagenese-Vektors erstrecken sich zwischen den Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bgl*II und *Sac*II. Unterbrochen werden die homologen Bereiche nur durch die eingebrachte Leseraster-Mutation (*mPAP-A* – 2463delA), die eingebrachten diagnostischen Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen (*Bam*HI) und die Selektionsmarker-Kassette, die von zwei *loxP*-Erkennungssequenzen (Dreiecke) flankiert wird. Die Doppelpfeile markieren die Fragmente genomischer DNA und die zugehörigen Fragmentgrößen, die nach Spaltung mit *Bam*HI und Filterhybridisierung mit den angegebenen Proben 5'gen (*Bgl*II-Fragment) und 3'out (*Sac*II;*Bam*HI-Fragment) erhalten werden. Die Abkürzungen der verwendeten Restriktionsendonukleasen entsprechen Abb. 3.1.



Abbildung 3.13: Identifizierung der homolog rekombinanten *Gli3^{mPAP-A-neoflox}*-ES-Zellklone. Dargestellt ist das Ergebnis einer Filterhybridisierung mit der Probe 3'out nach restriktions-enzymatischer Spaltung der nach Mikroextraktion erhaltenen DNA mit *Bam*HI. In den mit * gekennzeichneten Spuren ist zusätzlich zu dem 18 kb Wildtyp-Fragment ein für die homologe Rekombination indikatives 4 kb großes DNA-Fragment zu erkennen. Der identifizierte Klon ist der Klon #170.

Unter den analysierten Klonen konnten 2 (0,5%) gefunden werden, die einen für eine erfolgreiche homologe Rekombination indikativen Längen-Polymorphismus zeigten.

	Anzahl
G418 ^r Klone isoliert	384
Klone analysiert	384
Homolog rekombinante	2 (0,5%)

Tabelle 5: Zusammenfassung der Transfektion mit dem pGli3^{mPAP-A-neoflox} –Vektor

Diese zwei Klone (#54 und #170), die keine Auffälligkeiten in ihrem Wachstumsverhalten zeigten und aufgrund ihrer Morphologie undifferenziert und somit pluripotent erschienen, wurden durch restriktionsenzymatische Spaltung und Filterhybridisierung im Detail untersucht. Es wurde die erfolgreiche homologe Rekombination erneut überprüft und die Integrität des *Gli3*-Lokus im Bereich der eingebrachten Mutation untersucht. Ferner sollte eine mögliche weitere Integration des Mutagenese-Vektors an einer anderen Stelle des Genoms oder eine Mehrfachintegration in das *Gli3*-Gen ausgeschlossen werden (Abb.3.14). Hierbei zeigte sich, daß die beiden analysierten Klone das erwartete Fragment-Muster aufweisen und nur die beabsichtigte Mutation im *Gli3*-Gen tragen.

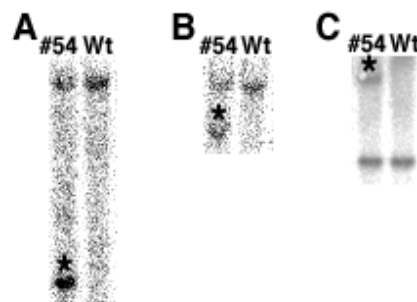


Abbildung 3.14: Die Charakterisierung der Klone #54 und #170 durch Filterhybridisierung ist am Beispiel der Analysen des Klones #54 dargestellt. (A) Filterhybridisierung von genomischer DNA des Klones #54 sowie von Wildtyp-ES-Zellen nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Bam*HI (B) unter Verwendung der Probe 5'gen. In dem untersuchten Klon zeigt sich zusätzlich zu dem Wildtyp- (18 kb) ein für die homologe Rekombination indikatives (14 kb) Fragment (*) nach der Spaltung mit *Bam*HI. (B) Filterhybridisierung der DNA-Proben aus (A) nach Spaltung mit *Bam*HI (B) mit der Probe 3'out. Es kann zusätzlich zu dem Wildtyp- (18kb) ein durch die erfolgreiche homologe Rekombination entstehendes (4kb) DNA-Fragment nachgewiesen werden. (C) Durch Filterhybridisierung der DNA-Proben aus (A) nach Spaltung mit *Bgl*II (Bg) unter Verwendung der Probe 3'out kann zusätzlich zu einem Wildtyp- (6kb) ein für die erfolgreiche homologe Rekombination indikatives (13,5kb) DNA-Fragment nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde auch hier eine Filterhybridisierung nach Spaltung mit *Eco*RV und der Verwendung der kodierenden Sequenz des *Neo*-Gens als Probe durchgeführt. Hierbei

konnte ebenfalls nur das erwartete DNA-Fragment nachgewiesen werden, so daß zusammen mit den anderen Filterhybridisierungen aus Abb. 3.14 davon ausgegangen werden kann, daß in dem untersuchten Klon keine Mehrfachintegrationen des Mutagenesevektors vorliegen. Der Klon #54 wurde für die weiteren Experimente eingesetzt (siehe 3.3.3).

3.3 Generierung von chimären Mäusen

Nach der Isolierung und Charakterisierung der homolog rekombinanten ES-Zellklone konnten diese für die Erzeugung von chimären Mäusen verwendet werden, die die Grundlage für die Etablierung und Analyse einer Mauslinie darstellen, die die gezielte Veränderung des *Gli3*-Gens trägt.

3.3.1 Verwendung der *Gli3*^{neo/tk}-ES-Zelllinie zur Herstellung chimärer Mäuse

Die Herstellung der chimären Mäuse durch Blastozysten-Injektion der *Gli3*^{neo/tk}-ES-Zelllinie wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Genetik; Arbeitsgruppe Rajewsky; Universität Köln durchgeführt. Es wurden zwei unabhängige homolog rekombinante *Gli3*^{neo/tk}-ES-Zellklone (#36 und #216) für die Injektionen in Blastozysten des Mausstammes C57Bl/6 verwendet.

ES-Zellklon	Anzahl transferierter Blastocysten	Anzahl Neugeborene	Anzahl Chimären	Geschlecht
#36	10	3	2	m
#36	10	6	6	2x m; 4x w
#36	10	-	-	-
#36	10	-	-	-
#216	10	1	(1) – gestorben	
#216	10	1	-	
#216	10	-	-	-
#216	9	7	(1) – gestorben	
#216	16	6	2	m
Summe	95	24	10 (12)	6m; 4w

Tabelle 6: Darstellung der Ergebnisse der Blastozysten-Injektionen der *Gli3*^{neo/tk}-ES-Zellklone. (m, männlich; w, weiblich)

Nach der Injektion von insgesamt 95 Blastozysten mit den beiden ausgewählten ES-Zellklonen wurden 24 Tiere geboren. Unter diesen waren 12 chimäre Tiere, von denen 10 überlebten. Hierunter waren 4 weibliche und 6 männliche Tiere.

3.3.2 Verwendung der $Gli3^{mPHS-neoflox}$ -ES-Zelllinie zur Herstellung chimärer Mäuse

Die Herstellung chimärer Mäuse wurde sowohl durch Blastozysten-Injektion der $Gli3^{mPHS-neoflox}$ -ES-Zelllinie, als auch durch Aggregation mit Embryonen des Morula-Stadiums versucht. Hierzu wurde primär der homolog rekombinante $Gli3^{mPHS-neoflox}$ -ES-Zellklon #80 und Blastozysten bzw. Embryonen des Morula-Stadiums des Mausstammes C57Bl/6 verwendet. Hierbei wurden allerdings entweder keine transferierbaren Blastozysten erhalten oder es wurden keine Tiere nach dem Transfer geboren.

3.3.3 Verwendung der $Gli3^{mPAP-A-neoflox}$ -ES-Zelllinie zur Herstellung chimärer Mäuse

Zur Herstellung chimärer Mäuse unter Verwendung der $Gli3^{mPAP-A-neoflox}$ -ES-Zelllinie wurden ebenfalls Blastozysten-Injektionen und Aggregationen mit Embryonen des Morula-Stadiums eingesetzt. Hierfür wurde der homolog rekombinante $Gli3^{mPAP-A-neoflox}$ -ES-Zellklon #54 verwendet. Entsprechend den Ansätzen unter 3.3.2 konnten auch hier entweder keine transferierbaren Blastozysten erhalten werden oder es wurden keine Jungtiere geboren.

3.4 Phänotypische Untersuchung der chimären Tiere

Die nach der Blastozysten-Injektion der homolog rekombinanten $Gli3^{neo/tk}$ -ES-Zellklone #36 und #216 erhaltenen chimären Tiere (siehe 3.3.1) wurden zunächst auf den Grad der Chimärität untersucht. Diese wurde anhand der Fellfarbe, die das offensichtlichste und am einfachsten zu bestimmende Merkmal darstellt, bestimmt (Übersicht bei JOYNER, A.L. 1999). Ausgehend vom Anteil einzelner Fellfarben am Gesamtfell wurde ein Grad der Chimärität von über 70% bei 4 von 10 Tieren festgestellt. Zusätzlich wurden die Tiere einer äußerlichen phänotypischen Untersuchung unterzogen. Hierbei zeigte sich bei den vier Tieren mit dem höchsten Grad der Chimärität eine morphologische Veränderung der Gliedmaßen. Es handelte sich um eine zusätzliche Finger-ähnliche Struktur an der postaxialen (posterioren) Seite der Vordergliedmaßen (Abb. 3.15). Die nähere Untersuchung zeigte, daß einige dieser zusätzlichen Finger sogar eine Krallen-ähnliche Struktur an ihrer Spitze besaßen. Dieser zusätzliche postaxiale Finger schien jedoch nicht

beweglich und somit funktionstüchtig zu sein und war sowohl in den einzelnen Tieren (rechts/links) als auch in der Gruppe der betroffenen Tiere unterschiedlich gut ausgebildet.

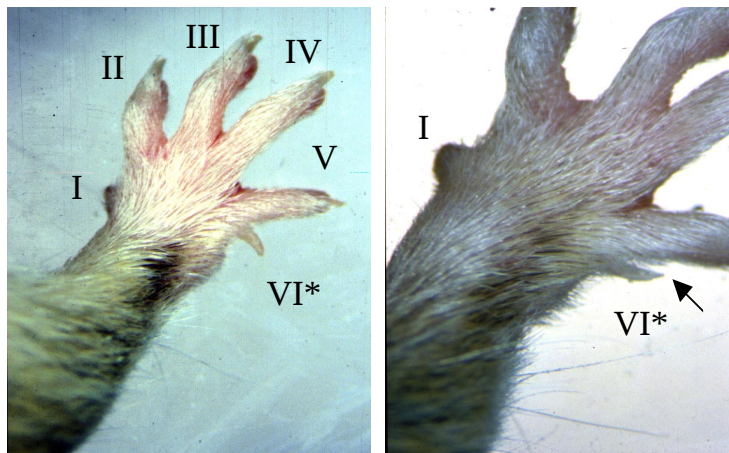


Abbildung 3.15: Gliedmaßenphänotyp der *Gli3^{neo/tk}*-ES-Zell-Chimären. Gezeigt sind die rechten Vordergliedmaßen von zwei verschiedenen Chimären. Die Finger-ähnliche Struktur (VI*) und die im Ansatz ausgebildete Krallen (Pfeil) sind auf der posterioren Seite der Gliedmaße deutlich zu erkennen. Anterior - links; posterior – rechts; I-V – Finger der Vordergliedmaße von anterior nach posterior; VI* - zusätzlich ausgebildeter Finger.

3.5 Testkreuzung auf Keimbahntransmission

Die Fähigkeit der Chimären, die genetischen Informationen und damit die eingefügte Mutation der ES-Zellen an ihre Nachkommen weiterzugeben, wurde durch Testkreuzungen untersucht. Diese sind die einfachste und zuverlässigste Methode, um sicherzustellen, daß die gezielt veränderten ES-Zellen einen Beitrag zur Bildung der Keimbahnzellen während der Embryonalentwicklung der Chimäre geleistet haben. Nur dann sind diese in der Lage, die gezielt in die ES-Zellen eingebrachte Veränderung zu vererben (Übersicht bei HOGAN, B. ET AL. 1994; TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997; JOYNER, A.L. 1999). Die durch Blastozysten-Injektion der Klone #36 und #216 der *Gli3^{neo/tk}*-ES-Zelllinie erhaltenen chimären Tiere wurden mit Mäusen des Stammes C57Bl/6 verpaart. Diese Art der Verpaarung ermöglichte aufgrund der Unterschiede in den für die Fellfarbe kodierenden Allelen „Agouti“, „Albino“ und „Pink-eyed dilution“ der beiden Ausgangsmaustämme, C57Bl/6 als Blastozysten-Spender und 129/OlaHsd als ES-Zell-Ursprung, eine schnelle und zuverlässige Unterscheidung zwischen Gameten mit ES-Zell- oder Blastozysten-Ursprung, so daß der Nachwuchs bereits wenige Tage nach der Geburt entsprechend selektioniert werden kann (Übersicht bei JOYNER, A.L. 1999).

Nr.	Klon	Geschlecht	Anzahl Nachkommen	Anzahl Agouti / Keimbahntransmission	Transmission der Mutation
1	#36	w	65	2	-
2	#36	w	5	2	-
3	#36	w	71	9	1x m; 2x w
4	#36	w	70	-	-
5	#36	m	83	73	-
6	#36	m	58	-	-
7	#216	m	33	-	-
8	#216	m	39	-	-
9	#36	m	142	-	-
10	#36	m	101	9	-
Σ			667	95	3

Tabelle 7: Testkreuzung der nach Blastozysten-Injektion von Klon #36 und #216 der *Gli3*^{neo/tk}-ES-Zelllinie erhaltenen Chimären mit Mäusen des Stammes C57Bl/6. (m: männlich; w: weiblich)

Aus den Testkreuzungen konnten insgesamt 667 Nachkommen erhalten werden. Diese wurden aufgrund der Fellfarbe (schwarz versus agouti) sortiert und es konnten 95 „Agouti“-Tiere isoliert werden. Diese Tiere deuten auf eine Keimbahntransmission des genetischen Materials der ES-Zelllinie hin und die Hälfte dieser Tiere sollte das veränderte *Gli3*-Allel der ES-Zelllinie tragen. Da bereits ein Teil (40%) der chimären Tiere einen deutlich sichtbaren Gliedmaßen-Phänotyp zeigten (siehe 3.4) wurden die „Agouti“-farbigen Nachkommen zunächst phänotypisch auf Veränderungen der Gliedmaßen hin untersucht. Hierbei konnten weder die Ausbildung einer Finger-ähnlichen Struktur an der postaxialen Seite der Vordergliedmaßen (siehe 3.4) noch eine andere Gliedmaßen-Veränderung gefunden werden. Auch die weiteren phänotypischen Untersuchungen zeigten keine offensichtlichen Veränderungen der Tiere. Durch die sich anschließende DNA-basierende Analyse der Tiere durch Schwanzbiopsie, Polymerase-Ketten-Reaktion und Filterhybridisierung (siehe 2.10.1; 2.12; 2.14; 3.6) konnten schließlich drei Tiere unter den Nachkommen der Chimäre #3 identifiziert werden, die Träger des gezielt veränderten *Gli3*^{neo/tk}-Allels waren (Abb. 3.16). Unter den restlichen Tieren konnten keine gefunden werden, die das mutierte *Gli3*-Allel anstelle des Wildtyp-*Gli3*-Allel der ursprünglichen ES-Zelle trugen.

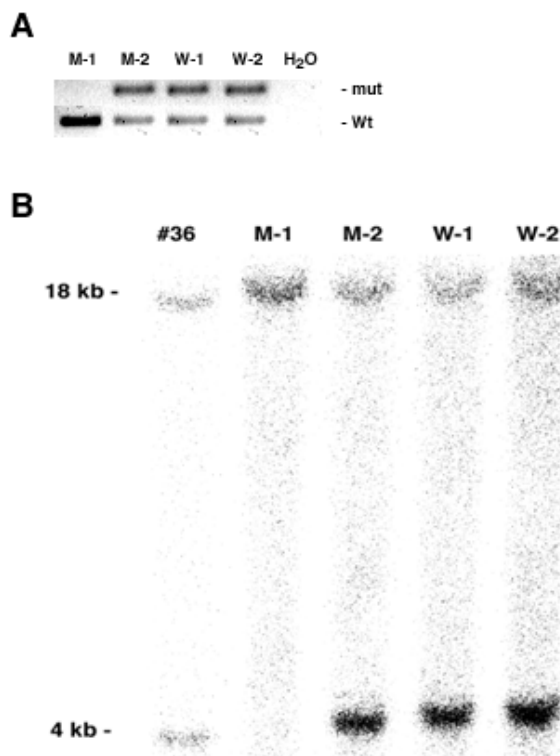


Abbildung 3.16: Identifizierung der Nachkommen der F1-Generation, die nach Keimbahntransmission des ES-Zellgenoms die eingebrachte *Gli3*^{neo/tk}-Mutation tragen.

(A) PCR-basierende Analyse der Nachkommen der Chimäre #3. Für die PCR-Amplifikation wurde die Oligonukleotid-Kombination neo-F2;neo-B2 verwendet. Die Amplifikation eines DNA-Fragments mit diesen Oligonukleotiden ist indikativ für das Vorhandensein des mutierten *Gli3*-Allels in den F1 Nachkommen (siehe 3.2). Zusätzlich wurde die Kombination 3'52;Seq-Intron-B1 zum Nachweis des Wildtyp *Gli3*-Allels verwendet. (B) Analyse der Tiere durch Filterhybridisierung. Als radioaktiv markierte Sonde wurde die in Abb. 3.5 als 3'out bezeichnete Probe verwendet. Das nachweisbare DNA-Fragment von 4 kb in den

F1 Tieren ist charakteristisch für die erfolgreiche homologe Rekombination in ES-Zellen und somit für das Vorhandensein des *Gli3*^{neo/tk}-Allels. #36 – parental ES-Zellklon #36, der zur Generierung der Chimäre verwendet worden ist; M-1 – männliches Geschwistertier; M-2 – männliches *Gli3*^{neo/tk}-Tier; W-1 und W-2 – weibliche *Gli3*^{neo/tk}-Tiere.

Die als Träger der gezielten *Gli3*-Mutation identifizierten Tiere (M-2; W-1; W-2) der F1-Generation wurden im Nachfolgenden zur Etablierung einer neuen Mauslinie verwendet.

3.6 Phänotypische Analyse der heterozygoten *Gli3*^{neo/tk/+}-Tiere

Die als Träger der gezielt in das Genom eingebrachten *Gli3*^{neo/tk}-Mutation identifizierten zwei Weibchen und ein Männchen wurden nach Erreichen der Geschlechtsreife zunächst mit Mäusen des Stammes C57Bl/6 und später auch mit Mäusen des Stammes 129P2 verpaart. Hierdurch sollte die eingebrachte *Gli3*-Mutation an die Nachkommen weitervererbt und eine neue Mauslinie etabliert werden, die die Analyse der Auswirkungen dieser *Gli3*-Mutation auf die normale Entwicklung der Maus ermöglicht. Die aus diesen Verpaarungen erhaltenen für die Mutation heterozygoten Jungtiere wurden durch die bereits beschriebene PCR-basierende Analyse von genomischer DNA aus Schwanzbiopsie-Material identifiziert (siehe 3.5). Bei diesen lebensfähigen und nach Erreichen der Geschlechtsreife fruchtbaren Tieren konnten keine offensichtlichen Fehlbildungen oder Störungen der normalen Mausentwicklung festgestellt werden. Auch die genauere

Untersuchung der inneren Organe ergab keine morphologischen Veränderungen. Der bei den chimären Mäusen beobachtete Gliedmaßen-Phänotyp konnte in diesen Tieren wie auch bereits in den Tieren der F1-Generation (siehe 3.5) zunächst nicht wiedergefunden werden. Erst nach der Rückkreuzung der Nachkommen der Chimäre #3 mit Mäusen des Stammes 129P2, der den Ursprungstamm der verwendeten ES-Zelllinie (ES 14-1) darstellt, konnte der zuvor beobachtete Gliedmaßen-Phänotyp wiedergefunden werden. Die in diesen heterozygoten Tieren beobachtete postaxiale Polydaktylie zeigte jedoch eine wesentlich schwächere Ausprägung als in den chimären Tieren und es kam zu einem deutlichen Absinken der Frequenz mit der die phänotypische Veränderung beobachtet werden konnte. So konnten während der anhaltenden Verpaarungen mit Tieren des Mausstammes 129P2 nur 5 von insgesamt 86 heterozygoten Nachkommen (6%) gefunden werden, die eine postaxiale Polydaktylie zeigten (Abb. 3.17).

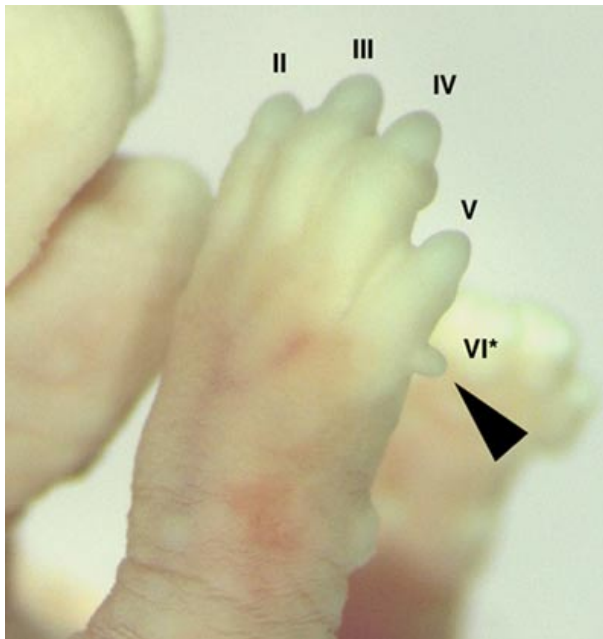


Abbildung 3.17: Postaxiale Polydaktylie in heterozygoten *Gli3^{neo/tk}*-Embryonen (E 16,5). Zusätzlich zu den normalen Fingeranlagen (I-V) in den Vordergliedmaßen zeigt sich bei diesem Embryo eine postaxiale Polydaktylie (Pfeil). Die zusätzliche Struktur (VI*) ist nur schwach ausgebildet und nur an einer der beiden Vordergliedmaßen zu finden.

Bei diesen 5 Tieren kam es außerdem teilweise noch zu einer nur unilateralen Ausprägung der Veränderung an den Vordergliedmaßen (n=2). Aufgrund der geringeren Fruchtbarkeit des Stammes 129P2 und der damit verbundenen insgesamt geringen Anzahl an Nachkommen, wurden die nachfolgenden Kreuzungen zur Generierung weiterer heterozygoter aber vorallem homozygoter Nachkommen mit Mäusen des Stammes C57Bl/6 durchgeführt. Hierbei kam es zu einem drastischen Einbruch der Frequenz mit der die postaxiale Polydaktylie der Vordergliedmaßen beobachtet werden konnte. Es konnten zusammen mit den bereits erwähnten Merkmalsträgern aus den Rückkreuzungen mit den 129P2-Mäusen nur insgesamt 8 von in der Summe 237 heterozygoten Tieren (3%)

gefunden werden, die eine Veränderung der Gliedmaßen an der postaxialen Seite zeigten. Zusätzlich zu der schwachen uni- oder bilateralen Ausbildung der Finger-förmigen Struktur an der postaxialen Seite der Vordergliedmaßen, konnte in diesen keinerlei knorpelige oder verknöcherte Strukturen durch Anfärbung der Knochen- und Knorpel-Strukturen (siehe 2.17) nachgewiesen werden (Abb. 3.18).

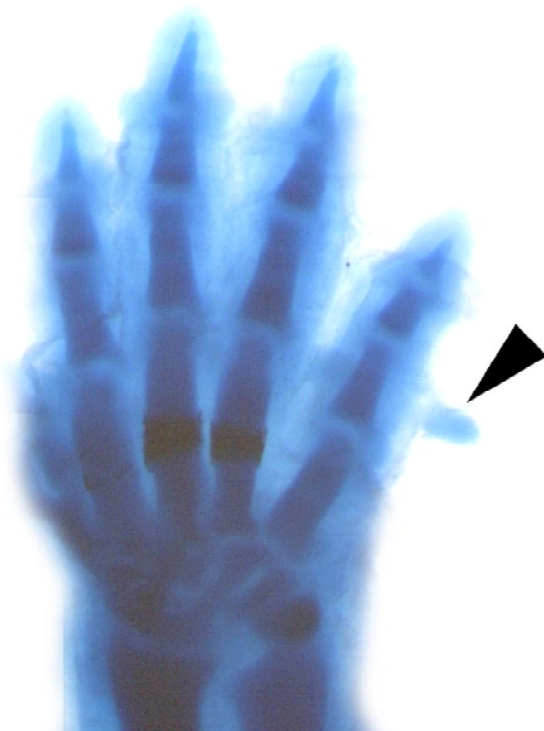


Abbildung 3.18: Knochen-Knorpel-Färbung der Extremitäten von heterozygoten *Gli3*^{neo/tk}-Embryonen (E 16,5). In der zusätzlich zu den normalen Fingeranlagen (I-V) in den Vordergliedmaßen schwach ausgebildeten Struktur (VI*) lassen sich keine verknorpelten oder verknöcherten Elemente zeigen (Pfeil).

3.7 Charakterisierung des *Gli3*^{neo/tk}-Transkripts

Nach der Etablierung der *Gli3*^{neo/tk}-Mauslinie und der Beobachtung des nur mit sehr geringer Frequenz in heterozygoten Tieren auftretenden Gliedmaßen-Phänotyps wurde die Isolierung und Charakterisierung des Transkripts vom *Gli3*^{neo/tk}-Allel durchgeführt. Hierdurch sollte überprüft werden, ob der beobachtete Phänotyp der heterozygoten Tiere und die nachfolgend zu analysierenden Veränderungen der homozygoten Tiere mit der gezielt in das *Gli3*-Gen eingeführten Mutation korreliert werden kann bzw. ob durch diese Manipulation ein Transkript/Protein entsteht, das für die phänotypischen Veränderungen ursächlich sein kann. Zunächst wurden nach Verpaarung heterozygoter Tiere Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (E 11,5 und 14,5) isoliert. Diese wurden anschließend verwendet um Gesamt-RNA zu isolieren (siehe 2.10.3). Die gleichzeitig präparierten embryonalen Membranen wurden zur Isolierung genomischer DNA (siehe 2.10.1) verwendet. Diese wurden anschließend in einem PCR-basierenden Ansatz, der im

Wesentlichen dem bereits beschriebenen gleicht (siehe 3.5) verwendet, um die zur Gesamt-RNA-Präparation verwendeten Embryonen dem jeweiligen Genotypen zuordnen zu können (Abb. 3.19).

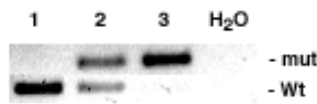


Abbildung 3.19: PCR-Analyse zur Genotypisierung von Wildtyp-, hetero- und homozygoten Embryonen. Aufgrund der für die PCR-Amplifikation ausgewählten Bedingungen konnte in homozygoten

Tieren kein DNA-Fragment mit der Oligonukleotid-Kombination 3'52;Seq-Intron-B1 amplifiziert werden. Hier konnte nur das für das mutierte Allel indikative Fragment mit der Oligonukleotid-Kombination neo-F2;neo-B2 erhalten werden. In heterozygoten Tieren konnten hingegen beide Fragmente, indikativ für das mutierte (mut) bzw. Wildtyp (wt)-Allel des *Gli3*-Gens erhalten werden. In Wildtyp-Embryonen konnte durch das Fehlen des *Neomycin Phosphotransferase*-Gens kein DNA-Fragment mit der Oligonukleotid-Kombination neo-F2;neo-B2, sondern nur mit der Kombination 3'52;Seq-Intron-B1 amplifiziert werden. Auf der Grundlage der unterschiedlichen DNA-Fragmente bzw. Fragment-Muster war somit eine eindeutige Unterscheidung zwischen den drei Genotypen gewährleistet. 1 – Wildtyp; 2 – heterozygot; 3 – homozygot

Hiernach wurden jeweils die Gesamt-RNA-Präparationen eines Wildtyp-, hetero- bzw. homozygoten Embryos nach photometrischem Konzentrationsabgleich für die reverse Transkription und nachfolgende PCR-Amplifikation einzelner cDNA-Fragmente eingesetzt (Siehe 2.12.2.; 2.12.3). Hierbei wurden die in Abbildung 3.20 (A) schematisch dargestellten Oligonukleotid-Kombinationen verwendet. Die PCR-Analyse ergab, daß die Integration der Selektionsmarker-Kassette in das *Gli3*-Gen keine Auswirkungen auf die *Gli3*-mRNA im untersuchten Bereich 5' und 3' der Integrationsstelle hat. Im Gegensatz dazu kommt es in unmittelbarer Nähe der Integrationsstelle zu einer Umstrukturierung der *Gli3*-mRNA und zur Bildung eines artifiziellen Transkripts (Abb. 3.20 B), das scheinbar durch eine kryptische Splice-Akzeptoren-Stelle im 3'-Bereich des *TK*-Gens ermöglicht wird. Hierdurch kommt es zum Verlust von 131 bp *Gli3*-kodierender Sequenz und der gleichzeitigen Insertion von 59 bp Sequenz aus der Selektionsmarker-Kassette. Dieser Austausch der Sequenzen und der damit verbundene Verlust von 72 bp verursacht außerdem eine Leseraster-Mutation (Abb. 3.20, C), die eine vorzeitige Termination des *Gli3*-Proteins zur Folge hat und zur Verlängerung des Proteins um 22 nicht *Gli3*-spezifischen Aminosäuren führt (Abb 3.20, D).

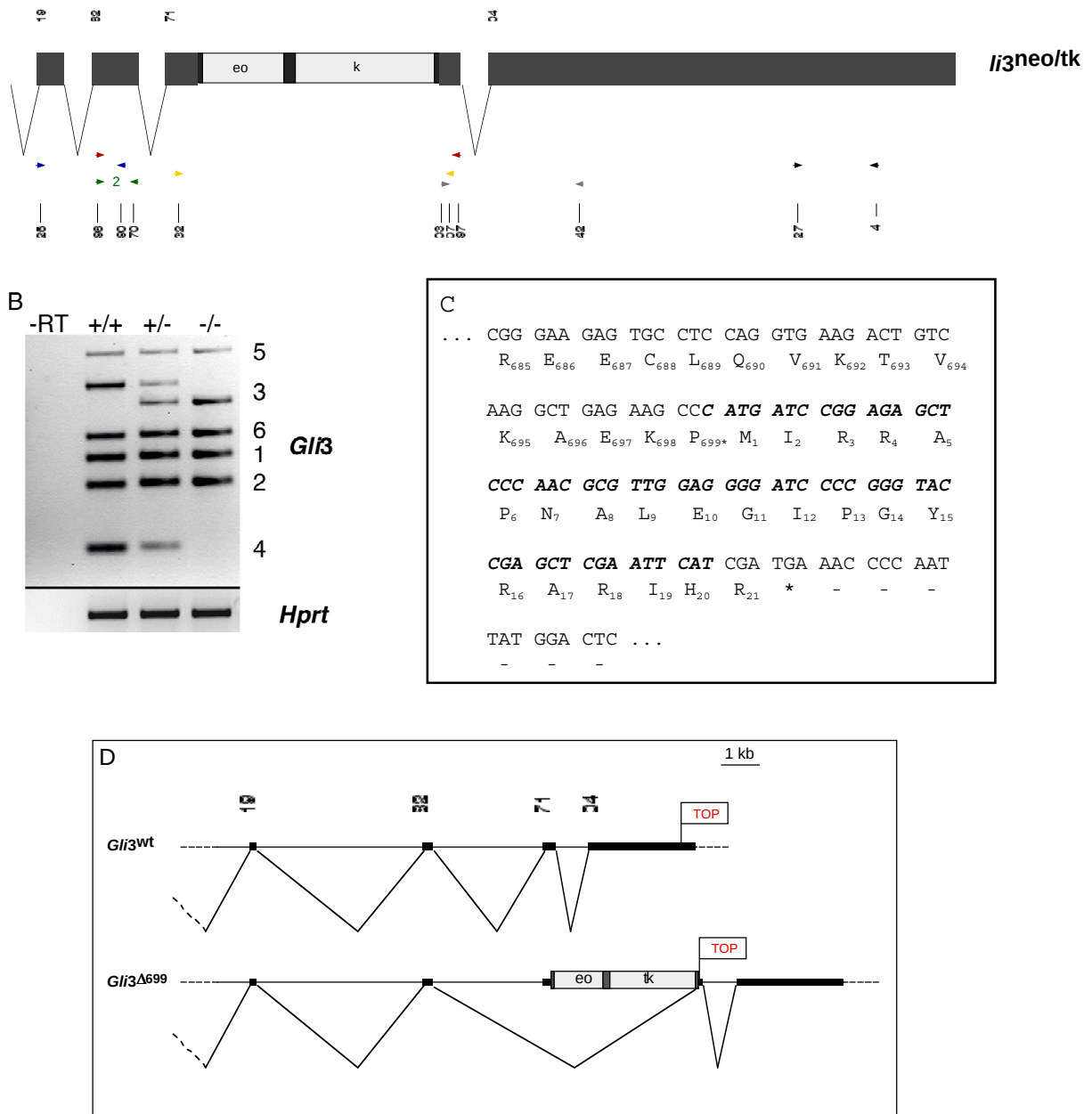


Abbildung 3.20: Charakterisierung des *Gli3*^{neo/tk}-Transkripts. (A) Schematische Darstellung der Intron-Exon-Struktur des *Gli3*-Gens in der für die eingebrachte Mutation relevanten Region 3' der Zink-Finger. Die Positionen der verwendeten Oligonukleotid-Kombinationen 1-6 sind durch verschiedenfarbige Pfeile dargestellt. 1 – ZF-F2;ZF-B4 / 2 – hGLI3-F1;ZF-B5 / 3 – hGLI3-F1;ZF-B8 / 4 – 3'52;Gli3-B2507 / 5 – Seq2403-F1;Seq3142-3121 / 6 – 3'F4;3'F1 (B) PCR-Amplifikation indikativer cDNA-Fragmente mit den in (A) dargestellten Oligonukleotid-Kombinationen nach reverser Transkription der mengenmäßig gegeneinander abgeglichenen Gesamt-RNAs mit einem oligodT-Oligonukleotid. Die mit den Oligonukleotid-Kombinationen 1; 2; 5 und 6 erhaltenen DNA-Fragmente zeigten keinen Unterschied in der Länge oder der Intensität zwischen den drei analysierten Genotypen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Integration der Selektionsmarker-Kassette in das *Gli3*-Gen keine Auswirkungen auf die gebildete mRNA im untersuchten Bereich 5' bzw. 3' der Integrationsstelle hat. Im Gegensatz dazu ergaben die PCR-Amplifikationen mit den Oligonukleotid-Kombinationen 3 und 4 ein unerwartetes Fragmentmuster. So zeigte sich mit der Kombination 4 in heterozygoten Embryonen eine Halbierung der Intensität des amplifizierten Fragments im Vergleich

zum Wildtyp und ein vollständiger Verlust des Fragments in dem verwendeten Material des homozygoten Embryos. Mit der Kombination 3 kam es im heterozygoten Zustand ebenfalls zur Mengenabnahme des amplifizierten Fragments (a) auf die Hälfte. Im homozygoten Zustand kam es sogar zu einem vollständigen Verlust des Fragments (a). Zusätzlich hierzu trat in den heterozygoten Embryonen ein kleineres Fragment (b) von annähernd gleicher Intensität wie das Wildtyp-Fragment (a) auf. Dieses für das mutierte Allel spezifische Fragment (b) konnte in doppelter Menge in homozygoten Tieren erhalten werden. Hier liegt somit eine Veränderung der *Gli3*-mRNA im Bereich der Integrationsstelle vor, die im Nachfolgenden durch Sequenzanalyse des amplifizierten Fragments überprüft wurde. Mit anderen zusätzlichen Oligonukleotid-Kombinationen, die die Amplifikation eines Fusionstranskripts aus *Gli3*- und dem *neo*-Gen bzw. dem *TK*- und dem *Gli3*-Gen ermöglichen, konnten keinerlei Fragmente in den drei Genotypen erhalten werden. Zum Abgleich der einzelnen Proben wurde zusätzlich die PCR-Amplifikation des ubiquitären *Hprt*-Transkripts mit der Kombination 5'Hprt;3'Hprt durchgeführt. –RT – keine reverse Transkriptase; +/+ - Wildtyp; +/- - heterozygoter Embryo; -/- - homozygoter Embryo (C) Sequenzanalyse des durch PCR-Amplifikation mit der Oligonukleotid-Kombination 3 erhaltenen Fragments des *Gli3^{neo/tk}*-Transkripts. Dargestellt ist die Nukleinsäure-Sequenz und die abgeleitete Aminosäure-Sequenz im Ein-Buchstaben-Code. Die Sequenzanalyse des PCR-Fragments 3 zeigt, daß es in den Mutanten zur Bildung eines artifiziellen Transkripts kommt. Die nicht zu *Gli3* gehörenden Nukleotide sind kursiv und fett dargestellt. Der Index gibt die Nummerierung der einzelnen Aminosäure an. Die Bildung dieses Transkripts wird scheinbar durch eine kryptische Splice-Akzeptoren-Stelle im 3'-Bereich des eingebrachten Thymidin-Kinase-Gens ermöglicht. Außerdem kommt es hierdurch zu einer Verschiebung des Leserasters, die eine vorzeitige Termination (*) des Proteins zur Folge hat. (D) Schematische Darstellung des Wildtyp- und des mutierten Transkripts basierend auf (B) und (C).

Basierend auf dem in *Gli3^{neo/tk}*-Mutanten identifizierten Transkripts, das entgegen den Erwartungen (siehe 3.1) nicht bei dem Kodon für Aminosäure 744 des Gli3-Proteins sondern bei dem Kodon für Aminosäure 699 zu einem vorzeitigen Abbruch der für Gli3 kodierenden Sequenzen führt, wurde die *Gli3^{neo/tk}*-Mutation als *Gli3^{Δ699}* bezeichnet.

3.8 Analyse der homozygoten *Gli3^{Δ699}*-Tiere

Nach der Verpaarung von heterozygoten Tieren konnten zunächst keine homozygoten Nachkommen unter den Absatztieren gefunden werden. Dieses Fehlen von homozygoten Mutanten und einem erhöhten Anteil von heterozygoten Tieren in den einzelnen Würfen (Abweichung vom erwarteten Mendelschen 1:2:1-Verhältnis der einzelnen Genotypen) deutete auf eine embryonale oder frühe neonatale Letalität hin. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden definierte Embryonalstadien zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung isoliert und die aus den extraembryonalen Membranen gewonnene DNA der bereits beschriebenen PCR-Analyse (siehe 3.7) zur Identifizierung der einzelnen Genotypen unterzogen. Hierbei zeigte sich, daß zu den untersuchten Zeitpunkten E8,5; E12,5; E16,5 und E18,5 der Mausentwicklung sowohl Wildtyp-, und heterozygote als auch

homozygote Embryonen in einer normalen Mendelschen Verteilung gefunden werden konnten. Es konnte somit nicht von einer embryonalen Letalität ausgegangen werden, so daß ein frühes neonatales Sterben der Nachkommen angenommen werden mußte. Eine genaue Beobachtung trächtiger Weibchen am Wurfstag zeigte, daß die homozygoten Tiere zunächst lebend geboren werden, atmen und in der Lage sind sich zu bewegen, dann aber im Verlauf der ersten 12 Stunden nach der Geburt sterben.

3.8.1 Das äußere Erscheinungsbild der $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Tiere

Eine erste grobe, äußerliche Betrachtung der homozygoten $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Tiere ließ keine offensichtlichen Abnormalitäten erkennen. Die Neugeborenen atmeten und zeigten keine äußeren Anzeichen einer Sauerstoffunterversorgung, es waren keine Ödeme oder sonstige Veränderungen der Haut zu erkennen, sie bewegten sich entsprechend ihrer Fähigkeiten und wurden zusammen mit ihren Geschwister von der Mutter im Nest versorgt und lagen nicht isoliert im Käfig. Bei genauer vergleichender Betrachtung fiel jedoch auf, daß die homozygoten Tiere im Gegensatz zu ihren heterozygoten oder Wildtyp-Geschwistern keinen sog. Milchbauch zeigten (Abb.3.21). Außerdem erschienen die Vorder- sowie Hinterextremitäten der homozygoten Tiere im Vergleich zu ihren Geschwistern verkürzt und verdickt.



Abbildung 3.21: Vergleich eines Wildtyp- mit einem homozygoten Tier wenige Stunden nach der Geburt. Das homozygote Tier zeigt eine im Vergleich zum Wildtyp normale äußere Erscheinung. Als deutlicher Unterschied zwischen den beiden Tieren läßt sich das Fehlen des sog. Milchbauches im homozygoten Tier erkennen, der im Gegensatz dazu im Wildtyp gut erkennbar ausgebildet ist (Pfeil). Eine Veränderung der Gliedmaßen (Verkürzung) ist nur andeutungsweise zu erkennen.

Die Untersuchung von verschiedenen Embryonalstadien ergab außerdem, daß die homozygoten Tiere eine intrauterine Wachstumsverzögerung aufweisen. Das heißt, daß in der Regel die homozygoten Tiere kleiner sind als ihre heterozygoten oder Wildtyp-Geschwister (Abb. 3.22). Die Wachstumsverzögerung ist besonders auffällig zwischen E10.5 und E12.5 der Entwicklung. Zu späteren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung lassen sich meist keine so deutlichen Unterschiede in der Größe der Embryonen mehr erkennen.



Abbildung 3.22: Wachstumsverzögerung von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen während der Embryonalentwicklung.

Dargestellt sind ein Wildtyp- und ein homozygoter Embryo am Tag 11,5 der Embryonalentwicklung. Das verzögerte Wachstum des homozygoten Embryos ist deutlich zu erkennen.

Nach dieser ersten groben, rein äußerlichen Untersuchung von Neugeborenen und Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien, ergaben die detaillierten Analysen der *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Mutante eine Vielzahl von teilweise schweren Entwicklungsstörungen. Alle beobachteten und im nachfolgenden beschriebenen Veränderungen konnten in mindestens drei voneinander unabhängigen Analysen mit Nicht-Geschwister-Tieren gezeigt werden.

3.8.2 Untersuchung des Skeletts von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen

Zur Untersuchung des Skeletts von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen auf mögliche Veränderungen wurden Knochen-Knorpel-Färbungen (siehe 2.17) von Wildtyp- und homozygoten Embryonen angefertigt. Die erste vergleichende Untersuchung dieser angefärbten Skelette (Abb. 3.23) zeigte keine schweren Mißbildungen oder das Fehlen einzelner Elemente des Skeletts. Es zeigten sich jedoch Veränderungen des Extremitätenskeletts sowohl in den Vorder- wie auch Hintergliedmaßen. Die Untersuchung der beobachteten Veränderungen der Gliedmaßen werden unter 3.8.3 ausführlich dargestellt.



Abbildung 3.23: Vergleich eines Wildtyp-Skeletts mit dem eines homozygoten Embryos (E 18,5). In den homozygoten Tieren zeigen sich keine offensichtlichen schwerwiegenden Veränderungen außerhalb des Extremitätenskeletts, das u.a. deutliche Verkürzungen der einzelnen Röhrenknochen aufweist.

Die nähere Analyse der einzelnen angefärbten Skelettstrukturen ergab jedoch, daß in einigen Strukturen Störungen der Entwicklung erkennbar sind. So lassen sich milde Defekte des Schädelskeletts der homozygoten Tiere feststellen. Der Schädel erscheint insgesamt leicht vergrößert. Dieses ist an dem größeren Abstand zwischen der anterioren Spitze der Nasenkapsel und dem Foramen magnum deutlich zu erkennen. Außerdem zeigt der Frontalknochen insgesamt eine stärkere Wölbung ausgehend von der koronalen Naht zwischen Frontal- und Parietalknochen hin zum Nasenknochen (Abb 3.24). Zusätzlich zu diesen milden Veränderungen der Schädelknochen treten aber weitere deutliche und schwerwiegende Veränderungen des kranialen Skeletts auf. Besonders hiervon betroffen sind die Schädelbasisknochen. Der Basisphenoid-Knochen wird in den homozygoten Tieren während der Entwicklung gebildet, zeigt aber Veränderungen in seiner Morphologie und weist ein Loch auf, das unterschiedlich stark ausgeprägt aber immer vorhanden ist (Abb. 3.25). Ferner zeigt der Presphenoid-Knochen eine Verzögerung der Verschmelzung seiner beiden Hälften, so daß ein dünner nicht-verknöcherter Spalt in den homozygoten Tieren zu erkennen ist (Abb. 3.24). Dieser Spalt bzw. das Ausbleiben der

Verknöcherung ist ein Anzeichen für die Ausbildung einer leichten Kiefer-Kaumen-Spalte in den homozygoten Tieren.

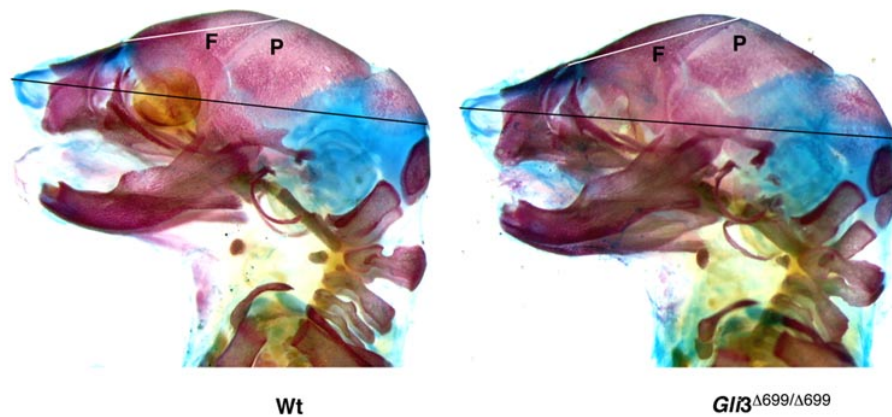


Abbildung 3.24: Milde kraniale Defekte in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Mutanten (E 18,5). In den homozygoten Tieren ist eine Vergrößerung des Schädels festzustellen, die am deutlichsten an dem größeren Abstand zwischen anteriorer Spitze der Nasenkapsel und dem Foramen magnum zu erkennen ist (schwarze Linie). Außerdem ist der Frontalknochen in der Mutante stärker gewölbt und der Abstand zwischen der Grenze von nasalem und frontalem Knochen und der Grenze zwischen frontalem und parietalem Knochen ist vergrößert (weiße Linie). F – frontaler Knochen; P – parietaler Knochen

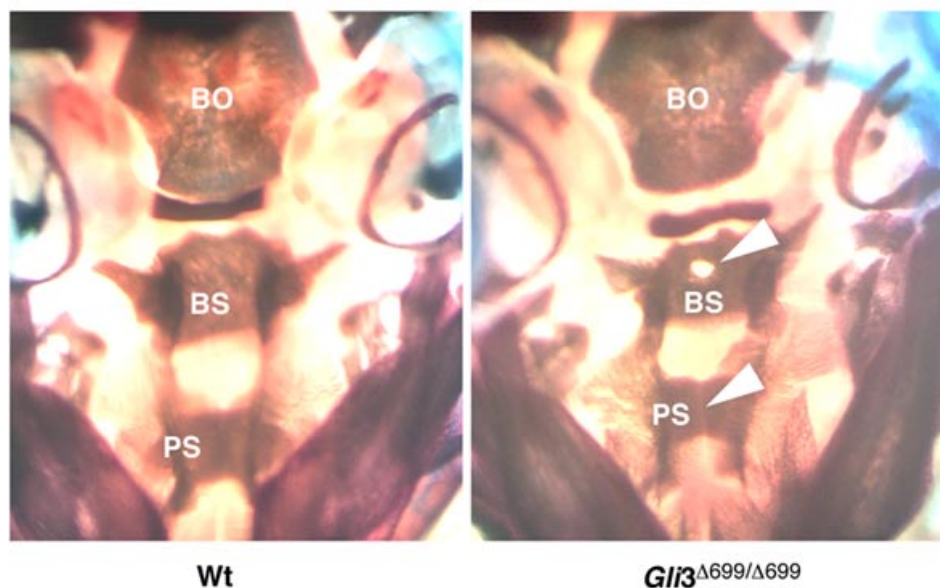


Abbildung 3.25: Veränderungen der Schädelbasisknochen in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 18,5). Homozygote Embryonen zeigen eine deutliche morphologische Veränderung des Basisphenoid-Knochens (BS), der zusätzlich noch ein Loch aufweist (Pfeil). Zusätzlich hierzu zeigt sich eine verzögerte Verknöcherung des Presphenoid-Knochens (PS) in diesen Embryonen (Pfeil), die deutlich an dem vorhandenen nicht-verknöcherten Spalt zwischen den beiden Hälften des Knochens zu erkennen ist. Der Basioccipital-Knochen (BO) weist jedoch keinerlei Veränderungen auf.

Im weiteren Verlauf der Skelett-Analysen wurden die Anzahl der Rippen, ihre Ausbildung und ihre Fusion mit den Wirbelkörpern und dem Sternum sowie das Sternum selbst untersucht. Hierbei konnten keinerlei Abnormalitäten der Ausbildung des Brustkorbes und des Sternums gefunden werden (Abb. 3.22). In diesem Zusammenhang wurde auch die Entwicklung der Wirbelsäule (Übersicht bei FAVIER, B. UND DOLLÉ, P. 1997) in Wildtyp- und homozygoten Embryonen untersucht. Im Gegensatz zu den zervikalen (C1-C7) und den thorakalen (T1-T13) Wirbeln, die keinerlei Veränderungen oder Verschmelzungen aufweisen, zeigten sowohl die lumbalen (L1-L6) als auch die sakralen (S1-S4) Wirbel Veränderungen auf. Hier konnte eine vorzeitige Verknöcherung und Verbindung der dorsalen (neuralen) Bögen mit den Wirbelkörpern beobachtet werden. Ferner konnte eine verknöcherte Verbindung zwischen benachbarten Wirbeln gefunden werden. Diese Fehlbildungen erstrecken sich von kranial nach kaudal im Bereich der Wirbel L2 bis S3 (Abb. 3.26).

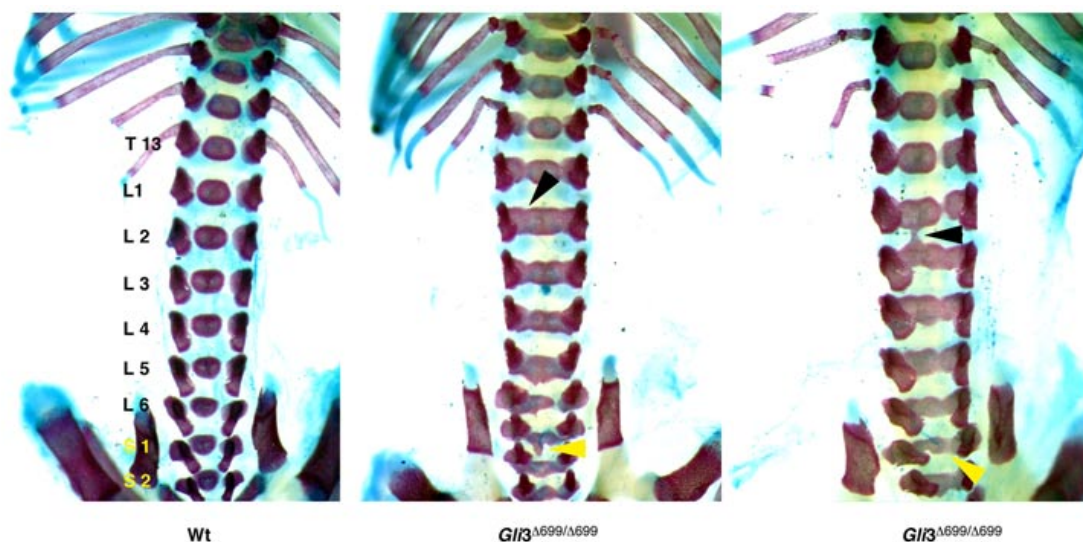


Abbildung 3.26: Vorzeitige Verknöcherung und Verschmelzung benachbarter Wirbelkörper in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 18,5). Im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (Wt) des gleichen Entwicklungsstadiums lässt sich in homozygoten Embryonen eine vorzeitige Verknöcherung der Wirbel erkennen. Hierbei wird die Verbindung zwischen den dorsalen (neuralen) Bögen und den Wirbelkörpern vorzeitig mineralisiert und es kommt zusätzlich zu einer verknöcherten Verbindung zwischen benachbarten Wirbeln. Die beobachteten Veränderungen treten nur kaudal von L1 auf und erstrecken sich von L2 bis L6 (schwarzer Pfeil) und von S1 bis S3 (gelber Pfeil).

Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten zu Tieren mit einer das *Pax1*-Gen inaktivierenden Mutation (WALLIN, J. ET AL. 1994; WILM, B. ET AL. 1998) wurden erste molekulare Analysen des Wirbelsäulenphänotyps durchgeführt. Die Analyse auf eine möglicherweise veränderte Expression von *Pax1* in sklerotomalen Zellen ergab jedoch

keinerlei Hinweise auf eine Störung der normalen *Pax1*-Expression in homozygoten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen am Tag 10,5 der Entwicklung (Abb. 3.27).

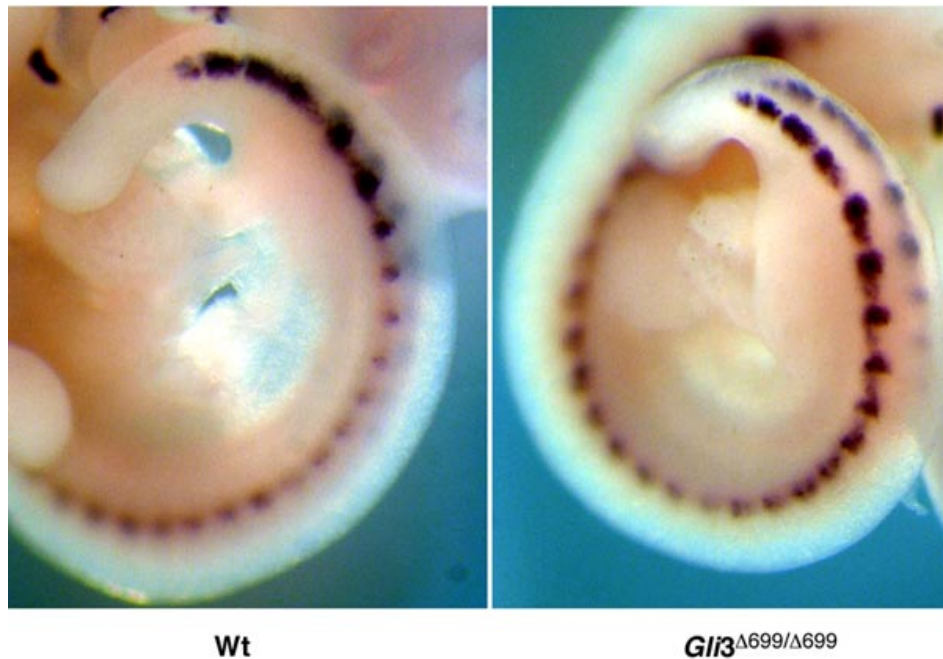
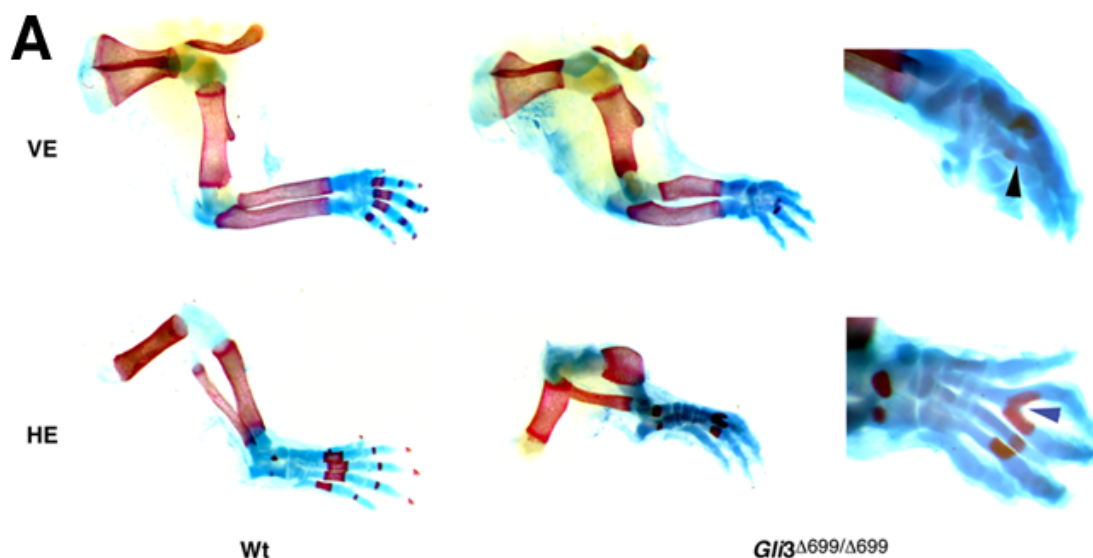


Abbildung 3.27: Expressionsanalyse des *Pax1*-Gens in Wildtyp und *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 10,5). Die Analyse der *Pax1*-Expression durch „Whole mount“ *in situ*-Hybridisierung zeigt keine Veränderungen zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung in homozygoten Embryonen.

3.8.3 Gliedmaßen-Phänotyp

Bei der ersten Betrachtung der Gliedmaßen im Zusammenhang mit der vergleichenden Analyse des Skeletts von Wildtyp- und homozygoten Embryonen (siehe 3.8.2) bestätigte sich der bereits zuvor gewonnene Eindruck (siehe 3.8.1), daß das Extremitätenskelett der Vorder- und besonders der Hintergliedmaßen insgesamt unsymmetrisch erschien. Die nähere Untersuchung (Abb. 3.28) ergab, daß die Röhrenknochen der Vordergliedmaßen (Femur, Radius und Ulna) verkürzt und verdickt sind und das Radius und Ulna leicht gebogen sind. Die Röhrenknochen der Hinterextremitäten (Humerus, Tibia, Fibula) weisen eine deutlich stärkere Verkürzung und Verdickung auf und die Tibia zeigt eine sehr starke fast einen rechten Winkel erreichende, Verbiegung. Hiermit verbunden ist eine deutliche Fehlstellung der hinteren Extremitäten. Zusätzlich zu den Fehlbildungen von Stylopod und Zeugopod konnten auch im Autopod deutliche Veränderungen der normalen Gliedmaßenentwicklung erkannt werden. In den homozygoten *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen

kann sowohl in den Vorder- als auch in den Hinterextremitäten eine zentrale Polydaktylie gefunden werden. Diese ist unterschiedlich stark ausgeprägt zwischen unterschiedlichen Tieren aber auch innerhalb eines Tieres (Vorder-, Hinterbein). Außerdem kann es sich um eine bi- oder unilaterale Form der Polydaktylie handeln und der zusätzlich ausgebildete Finger muß nicht immer äußerlich erkennbar sein. Im Detail zeigt sich zunächst, daß die ausgebildeten Knochenelemente, die die zusätzlichen Finger bzw. Fingeranlagen darstellen, den Metacarpalen bzw. -tarsalen entspringen. In einer Vielzahl von Fällen kommt es danach aber nicht zu einem Auswachsen und der Ausbildung eines vollständig ausgeformten Fingers, so daß in diesen Fällen die zentrale Polydaktylie nicht sofort erkennbar ist. Der neu ausgebildete Finger bzw. die verknorpelte und verknöcherte zusätzliche finger-artige Struktur kann in den betroffenen Gliedmaßen entweder in einer Ebene mit den anderen Fingern entstehen, oder es kommt zu einer Positionierung unterhalb des Fingers 3 (Abb.3.28), so daß hier die ektopisch ausgebildete Struktur in der dorso-ventralen und nicht in der anterior-posterioren Achse zu finden ist. Häufig weisen die zentral eingefügten Knochenelemente keine Gliederung auf, da die Gelenkstrukturen fehlen. Zusätzlich kann es zu einer Aufspaltung des Fingers 4 im Bereich der Metacarpalen bzw. -tarsalen kommen, so daß zwei Reihen von Phalangen einem carpalen bzw. tarsalen Knochen entspringen. Weiterhin auffällig ist eine verzögerte Mineralisierung und Verknöcherung im Autopod der homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen, die sich deutlich an den Verknöcherungszentren der Phalangen der Vorder- sowie Hinterextremitäten erkennen läßt (Abb 3.28).



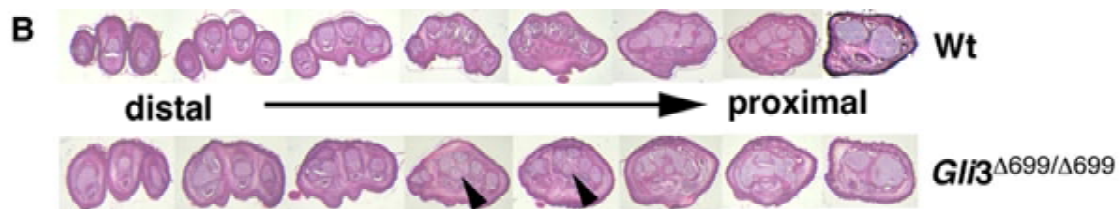


Abbildung 3.28: Gliedmaßen-Phänotyp der homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Mutanten. (A) Knochen-Knorpel-Färbungen des Gliedmaßen-Skeletts von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 18,5). Die proximo-distale Verkürzung der Gliedmaßen sowie die leichte Verbiegung von Radius und Ulna sowie Fibula und die besonders stark ausgeprägte Krümmung der Tibia sind deutlich zu erkennen. Der Vergleich von Wildtyp- und Mutanten-Autopod zeigt ferner eine deutliche Verzögerung der Mineralisierung bzw. Verknöcherung der tarsalen bzw. carpalen Knochen sowie der Phalangen. Außerdem zeigt sich die Ausbildung einer zentralen Polydaktylie, bei der der zusätzlich ausgebildete Finger einem carpalen bzw. tarsalen Knochenelement entspringt und entweder mit den anderen Fingern in einer Ebene liegt oder ventral versetzt ausgebildet wird (schwarzer Pfeil). Zusätzlich hierzu kann es zu einer Aufspaltung der Fingeranlagen kommen, so daß an einem Metacarpalen bzw. Metatarsalen zwei Reihen von Phalangen entspringen (blauer Pfeil). VE – Vorderextremität; HE – Hinterextremität (B) Hämatoxylin/Eosin-gefärbte transverse Paraffin-Dünnschnitte der Vordergliedmaßen von Wildtyp- und homozygoten Embryonen im Bereich der Phalangen (E 16,5). Die Schnitte zeigen eine normale Morphologie der homozygoten Mutanten-Gliedmaßen im Vergleich zum Wildtyp. Hiervon weicht jedoch der zusätzlich ausgebildete Finger ab, der wie hier deutlich zu erkennen ist aus der normalen Ebene der anderen Finger nach ventral verschoben sein kann (Pfeil). Die einzelnen Schnitte sind von distal nach proximal angeordnet. Außerdem sind die einzelnen Bilder so orientiert, daß anterior links und dorsal oben ist.

Die in Neugeborenen und fortgeschrittenen Embryonalstadien (E 18,5) beobachteten Veränderungen lassen sich auch bereits während der Entwicklung erkennen.

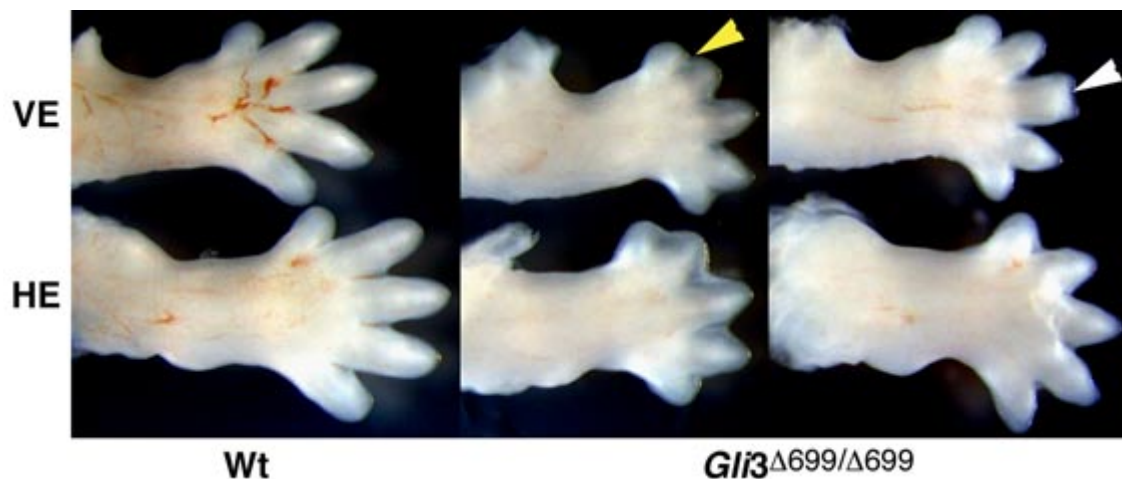


Abbildung 3.29: Zentrale Polydaktylie sowie proximo-distale Verkürzung der Gliedmaßen von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E14,5). Der Gliedmaßen-Phänotyp ist aufgrund der morphologischen Veränderungen bereits früh zu erkennen. Neben der proximo-distalen Verkürzung ist die Ausbildung der zentralen Polydaktylie (weißer Pfeil) deutlich sichtbar. Außerdem kommt es in den homozygoten Embryonen zu einer Erhaltung des interdigitalen Gewebes zwischen den einzelnen Fingeranlagen, so daß eine Gewebe-Syndaktylie auftritt (gelber Pfeil). Zusätzlich wird beim Vergleich der einzelnen

abgebildeten Mutanten-Gliedmaßen die Variabilität des Phänotyps sowie die teilweise nur unilaterale Ausprägung deutlich. VE – Vorderextremität; HE – Hinterextremität; anterior - oben; distal - rechts

Es kann anhand der veränderten Morphologie bereits am Tag 14,5 der Entwicklung die proximo-distale Verkürzung der Gliedmaßen (bes. des Autopods) und die zentrale Polydaktylie in den homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen deutlich erkannt werden. (Abb. 3.29). Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung läßt sich ebenfalls die Ausbildung eines Syndaktylie-Phänotyps in den homozygoten Embryonen erkennen (siehe unten).

Zusätzlich zu den rein morphologischen Veränderungen lassen sich bereits früher während der Gliedmaßenentwicklungen (E 13,5) molekulare Veränderungen erkennen. So zeigte die Expressionsanalyse von *Sox9*, einem essentiellen Transkriptionsfaktor in der Chondrogenese dessen Funktionsverlust zu einer vollständigen Blockade der Chondrozyten-Differenzierung führt (BI, W. ET AL. 1999), daß in homozygoten Tieren offensichtliche Veränderungen in der Knorpel-spezifischen Matrix der sich entwickelnden Gliedmaßen vorliegen. Aufgrund seiner Expression in chondrogenen Vorläuferzellen und Chondrozyten (WRIGHT, E. ET AL. 1995) zeigt sich in den homozygoten Tieren nicht nur die Verkürzung der Fingeranlagen, sondern auch die Ausbildung von zusätzlichen Anlagen in dem Bereich der Gliedmaßen, in dem im späteren Verlauf der Entwicklung die zentrale Polydaktylie gefunden werden kann (Abb. 3.30 A). Neben den Veränderungen der *Sox9*-Expression konnten auch Veränderungen im Expressionsmuster von *Noggin* festgestellt werden. *Noggin* ist ein Bmp (bone morphogenetic protein)-Antagonist, der im kondensierenden Knorpel und unreifen Chondrozyten exprimiert wird (BRUNET, L.J. ET AL. 1998). Es zeigte sich in homozygoten Embryonen neben einer Verkürzung und Verdickung der normalen Expressionsdomänen eine weitere ektopische Expression von *Noggin* (Abb. 3.30 B), die wie die *Sox9*-Expression mit den später beobachteten Veränderungen in den Gliedmaßen korreliert werden kann. Zusätzlich zu den beiden für Chondrogenese bzw. Chondrozyten spezifischen Genen wurde die Expression von *Gdf-5* untersucht. *Gdf-5* (*Growth and differentiation factor-5*) ist ein Mitglied der Bmp-Familie und ist durch seine Expression in den Gelenken wichtig für deren Spezifizierung (STORM, E.E. ET AL. 1994; STORM, E.E. UND KINGSLEY, D.M. 1999). Die Expressionsanalyse von *Gdf-5* in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen ergab, eine ektopische Expression von *Gdf-5* im interdigitalen Mesenchym im Bereich der Anlage des Fingers 3. Zusätzlich konnte eine Duplikation der Expressionsdomäne und somit des sich bildenden Gelenks im Finger 4 gefunden werden (Abb. 3.30 C).

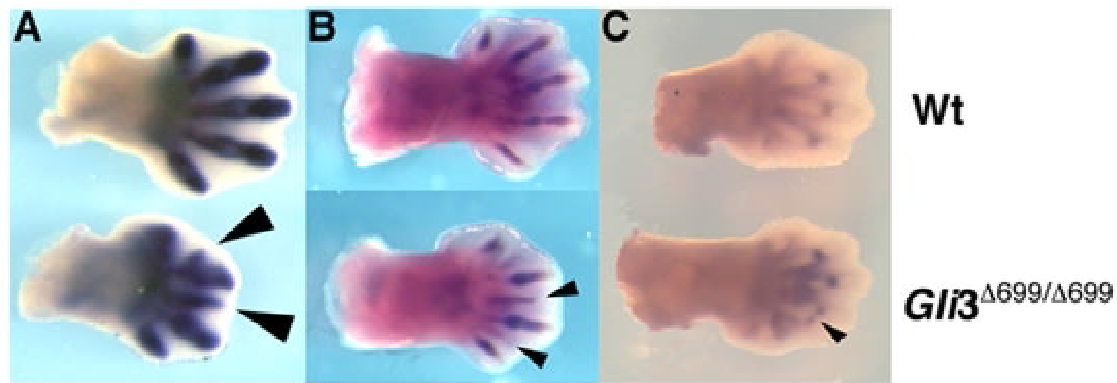


Abbildung 3.30: Expressionsanalyse von *Sox9*, *Noggin* und *Gdf-5* im sich entwickelnden Gliedmaßen-Skelett der Vorderextremitäten (E 13,5). (A) Neben der Verkürzung der Expressionsdomäne von *Sox9*, die mit der später beobachteten proximo-distalen Verkürzung der einzelnen Finger zu korrelieren ist, kann eine veränderte sowie ectopische Expression von *Sox9* gefunden werden (Pfeil). Dieses läßt sich mit den gefundenen zusätzlichen Fingeranlagen in Verbindung bringen. (B) Das Expressionsmuster von *Noggin* zeigt vergleichbare Abweichungen (Pfeil) vom Wildtyp-Muster wie das Expressionsmuster von *Sox9*. (C) Die Untersuchung der *Gdf-5* Expression zeigt ebenfalls deutliche Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. Hierbei läßt sich eine ectopische Expression von *Gdf-5* im interdigitalen Mesenchym erkennen. Weiterhin tritt eine räumlich dicht nebeneinander liegende Expression von *Gdf-5* in den untersuchten Gliedmaßen auf (Pfeil). Diese Expression läßt auf eine Gelenkduplikation bzw. Aufspaltung der Fingeranlagen schließen, die bereits in Abb. 3.29 A zu erkennen war. anterior – oben; distal - rechts

Ausgehend von den gefundenen Veränderungen der Gliedmaßen, die mit ihrer Differenzierung (bes. der Knorpel-spezifischen Matrix) verbunden werden können, wurde die frühe Gliedmaßen-Entwicklung in homozygoten Embryonen untersucht. Hierzu wurde die Expression verschiedener für die Musterbildung der Gliedmaßen wichtiger Gene untersucht (Übersicht bei COHN, M.J. UND TICKLE, C. 1996; JOHNSON, R.L. UND TABIN, C.J. 1997; SCHWABE, J.W.R. ET AL. 1998; VOGT, T.F. UND DUBOULE, D. 1999 sowie PIZETTE, S. UND NISWANDER, L. 1999; ZUNIGA, A. ET AL. 1999; DROSSOPOULOU, G. ET AL. 2000; CHARITE, J. ET AL. 2000; FERNANDEZ-TERAN, M. ET AL. 2000).

Zunächst wurde die Expression von *Fgf-8*, das ausreichend ist das gesamte genetische Programm der Gliedmaßeninitiation und nachfolgenden Musterbildung zu induzieren, untersucht. Nach der Ausbildung der Gliedmaßenknospe ist die *Fgf-8* Expression auf die sog. „apikale ektodermale Leiste“ (eng.: apical ectodermal ridge; AER) beschränkt. Diese ist von entscheidender Bedeutung für die anhaltende Proliferation der Zellen der Gliedmaßenknospe und das Auswachsen der späteren Extremitäten und somit wichtig für die Differenzierung entlang der proximal-distalen (P/D) Achse. Störungen der AER-Funktion, die häufig mit einer veränderten *Fgf-8* Expression verbunden sind, führen zu distalen Verkürzungen der Extremitäten. Die vergleichende Analyse der *Fgf-8* Expression in Wildtyp- und homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen zeigte keine Unterschiede (Abb. 3.31 A). Nicht nur die anhaltende Funktion der AER ist von zentraler Bedeutung für das

Auswachsen der Gliedmaßenknospe und die Musterbildung. Auch die Positionierung der AER ist von entscheidender Wichtigkeit. Die Positionierung der AER ist eng verknüpft mit der Spezifizierung der dorsal-ventralen (D/V) Achse der sich entwickelnden Extremität. Die Festlegung dorsal-ventraler Zellschicksale erfolgt durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die ausschließlich in dorsalen (*Wnt-7a*; *R-fng*; *Lmx-1* bzw. *Lmx-1b*) oder ventralen (*En-1*) mesodermalen bzw. ektodermalen Zellen der Gliedmaßenknospe exprimiert werden. In Mausmutanten, die eine Störung der Spezifizierung der D/V-Achse zeigen, wie z.B. *En-1*- oder *Wnt-7a*-Mutanten konnte eine gemeinsame Veränderung der Expression der aufgeführten D/V-Markergene gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde, von diesen für die Spezifizierung der D/V-Achse wichtigen Genen, exemplarisch die Expression von *Lmx-1b*, das ausschließlich im dorsalen Mesoderm exprimiert wird, analysiert. Hierbei konnten allerdings keine Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp und homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen gefunden werden (Abb. 3.31 B). Neben der Spezifizierung entlang der P/D- und D/V-Achse der Gliedmaßenknospe ist auch die Differenzierung entlang der anterior-posterioren Achse von zentraler Bedeutung. Wichtig für die Ausbildung der korrekten Anzahl und Morphologie der späteren Finger ist die Signalwirkung, die von der sog. „Zone polarisierender Aktivität“ (eng.: zone of polarizing activity; ZPA) im posterioren Mesenchym der Gliedmaßenknospe ausgeht. Das für diese morphogenen Eigenschaften der ZPA verantwortliche Molekül ist *Shh*. Die Expression von *Shh* kolokalisiert mit der ZPA-Aktivität und ektopische Expression von *Shh* führt zu einer Reorganisation der Musterbildung entlang der A/P-Achse der Gliedmaßenknospe und zur Polydaktylie. Die Analyse der *Shh* Expression in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen ergab keine auffälligen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (Abb. 3.31 C). Im Zusammenhang mit der Musterbildung entlang der A/P-Achse wurde ebenfalls die Expression von *dHAND* untersucht. *dHAND* scheint für die Etablierung der A/P-Achse von großer Bedeutung zu sein und wirkt oberhalb von *Shh* aktivierend auf die Expression von *Shh*, 5'*Hoxd*-Genen und *Bmp2*. Die Expressionsanalyse in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen ergab jedoch keine Hinweise auf eine veränderte Expression von *dHAND* im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (Abb. 3.31 D). Zusätzlich zu der Analyse der Expression eines während der Musterbildung oberhalb von *Shh* wirkenden Gens wurde auch die Expression des als Vermittler der *Shh*-Signalaktivität geltenden *Gli*-Familienmitgliedes *Gli1* (siehe 1.2.4) untersucht. Hier zeigte sich in den Vordergliedmaßen von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 11,5) eine Verringerung der Expression im Vergleich zu Vordergliedmaßen von Wildtyp-Embryonen. In den hinteren Gliedmaßen konnten keine Veränderungen zum untersuchten Zeitpunkt festgestellt werden (Abb. 3.31 E). Weiterhin wurde die Expression von *Bmp4* untersucht. *Bmp4* ist ein Mitglied der TGFβ-Superfamilie und ist genau wie *Bmp2* und *Bmp7* sehr dynamisch während der Gliedmaßenentwicklung exprimiert. Die *Bmp4* Expression ist in frühen Stadien in der AER und dem Mesenchym und später im sich entwickelnden Knorpel und dem interdigitalen Mesenchym zu finden. Neben einer Funktion während der Musterbildung kann auch von einer weiteren Funktion während der

Chondrogenese und dem programmierten Zelltod (Apoptose) ausgegangen werden. In homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen konnten im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen keine offensichtlichen Veränderungen in der Expression zu allen untersuchten Zeitpunkten gefunden werden (Abb. 3.31 F und Daten nicht gezeigt)

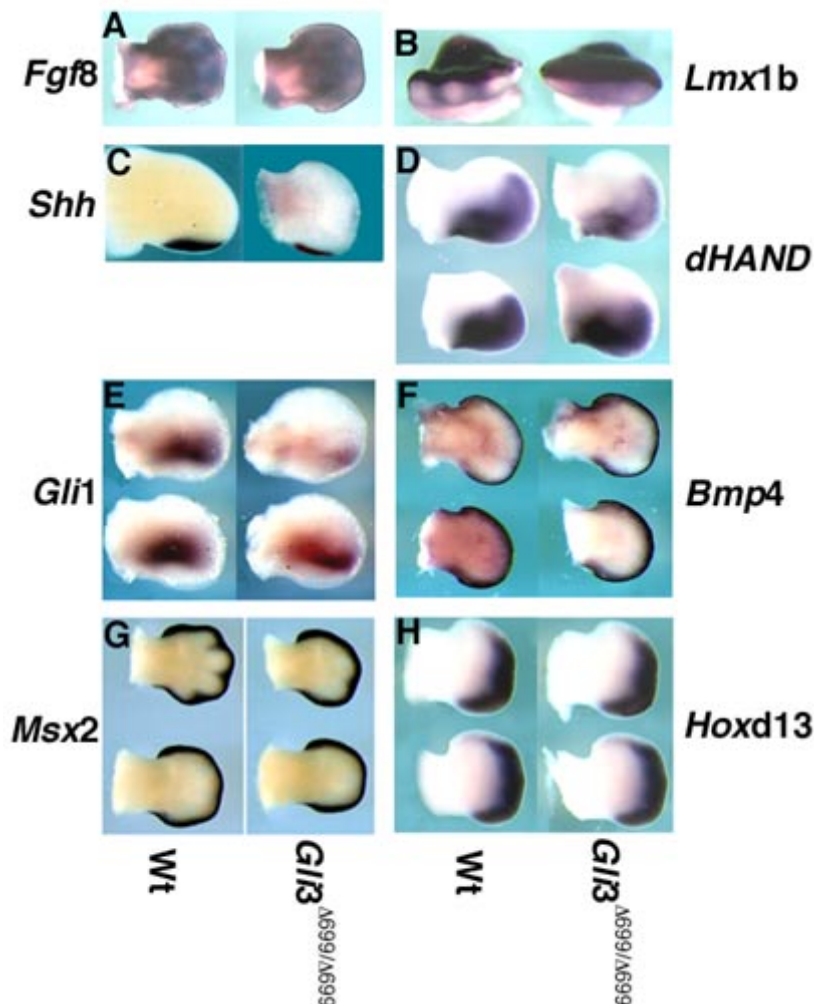


Abbildung 3.31:

Expressionsanalyse verschiedener für die Musterbildung der Gliedmaßen wichtiger Gene (E 11,5). Gezeigt sind in den einzelnen Bildern entweder die Vorderbein-Anlagen oder die Anlagen für Vorder- (oben) und Hinterbein (unten) (A) Die Expressionsanalyse von *Fgf-8* zeigt keine Veränderungen der Genexpression in den Anlagen der Vorderbeine im Wildtyp- und *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen. (B) Die Expression von *Lmx-1b* zeigt sowohl in Wildtyp- wie auch homozygoten Embryonen (Vorderbein-Anlage) eine scharfe Grenze entlang der D/V-Achse, dorsal – oben; ventral – unten (C) Die Expression von *Shh* (Vorderbein-Anlage) zeigt keine Unterschiede in der

Intensität und ist in beiden Genotypen auf die ZPA-Region beschränkt, anterior – oben; distal - rechts (D) Die Untersuchung der *dHAND* Expression lässt entsprechend der *Shh* Expression keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und homozygoten Embryonen erkennen, die mit einer gestörten Musterbildung der A/P-Achse korreliert werden könnten, anterior – oben; distal - rechts (E) Die Analyse der Expression von *Gli1* ergab eine Veränderung in den Vordergliedmaßen von homozygoten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern. In den Hintergliedmaßen konnten keine Veränderungen beobachtet werden. (F) Die Expression von *Bmp4* zeigte keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und homozygoten Embryonen, anterior – oben; distal - rechts (G) Die Analyse der *Msx2*-Expression als Zielgen und Mediator der *Bmp4* Aktivität ergab ebenfalls keine erkennbaren Veränderungen. Es zeigt sich eine leichte zeitliche Verzögerung der Expression aufgrund von Wachstumsunterschieden, anterior – oben; distal - rechts (H) Die Untersuchung der Expression des 5'*HoxD*-Gens *Hoxd13* ergab auch keine Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp- und homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen, anterior – oben; distal - rechts

Zusätzlich zu *Bmp4* wurde auch die Expression von *Msx2* untersucht, das ein Zielgen und Signalvermittler von *Bmp4* darstellt und an der Aktivierung des interdigitalen Zelltods beteiligt sein soll. Hierbei konnten jedoch keinerlei Expressionsunterschiede zwischen den beiden Genotypen erkannt werden (Abb. 3.31 G). Neben der frühen Musterbildung in der Gliedmaßenknospe ist auch das Wachstum und die Differenzierung einer mit ihrer positionellen Information versehenen Zelle von zentraler Wichtigkeit für die Gliedmaßenmorphogenese. Um dieses zu erreichen werden eine Reihe von wichtigen regulatorisch wirkenden Genen aktiviert. Hierzu gehören besonders die 5'-Mitglieder des *HoxD*-Clusters sowie die *Hox-13* Paralogen, die eine ausgeprägte Expression im späteren Zeugopod und Autopod zeigen und in der distalen Extremität für die Spezifizierung des Autopods entscheidend sind. Die Untersuchung der *Hoxd-13* Expression in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen ergab keine Veränderungen der Expression im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (Abb. 3.31 H).

Eine weitere Auffälligkeit der homozygoten Embryonen ist die bereits erwähnte und in Abbildung 3.29 erkennbare Syndaktylie der Vorder- und Hintergliedmaßen. Hierbei bildet sich das interdigitale Gewebe während der Gliedmaßenentwicklung nicht oder nicht vollständig zurück. Diese Rückbildung des interdigitalen Gewebes durch Apoptose und somit die Separation der einzelnen Finger ist jedoch von zentralen Bedeutung für die Morphologie der sich entwickelnden Gliedmaßen (Übersicht bei CHEN, Y. UND ZHAO, X. 1998) In den homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen ist die verminderte Rückbildung des interdigitalen Gewebes und das damit verbundene Auftreten der Syndaktylie deutlich zu erkennen. Neben den morphologischen Veränderungen konnte in den betroffenen homozygoten Embryonen eine deutliche Verringerung des interdigitalen programmierten Zelltods gezeigt werden (Abb. 3.32).

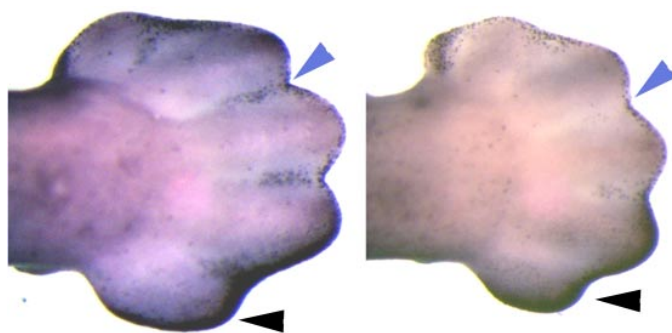


Abbildung 3.32: Verringerte Apoptose während der Gliedmaßenentwicklung in den Vordergliedmaßen von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 13,5). Die selektive Anfärbung apoptotischer Zellen durch die TUNEL-Methode (siehe 2.19) zeigt eine Verringerung des programmierten Zelltods in den sich entwickelnden Gliedmaßen. Es kommt zu einer deutlichen Abnahme der

Apoptose in den interdigitalen Bereichen (z.B. blaue Pfeile) bei einem konstanten Maß an Apoptose in den anterioren und posterioren Bereichen (z.B. schwarze Pfeile) der Extremität, so daß von einer klaren Korrelation der verringerten Apoptose mit dem Auftreten der Syndaktylie ausgegangen werden kann. Wildtyp – links; *Gli3*^{Δ699/Δ699} – rechts; anterior – oben; distal - rechts

Die Untersuchung des Gliedmaßen-Phänotyps zeigte weiter, daß die Entwicklung der ganz distalen Strukturen in den homozygoten Embryonen betroffen ist. Dies ist besonders auffällig bei der Ausbildung der Nägel. Die gestörte Nagelentwicklung (Abb. 3.33) betrifft sowohl die Vorder- als auch die Hintergliedmaßen der homozygoten Tiere, variiert aber stark in ihrer Aussprägung. Die Nägel sind meist überhaupt nicht ausgebildet bzw. nicht an den Fingerspitzen zu erkennen. In einigen wenigen Fällen sind die Nägel angelegt, zeigen dann aber nur eine sehr schwache und stark verkürzte Ausformung.

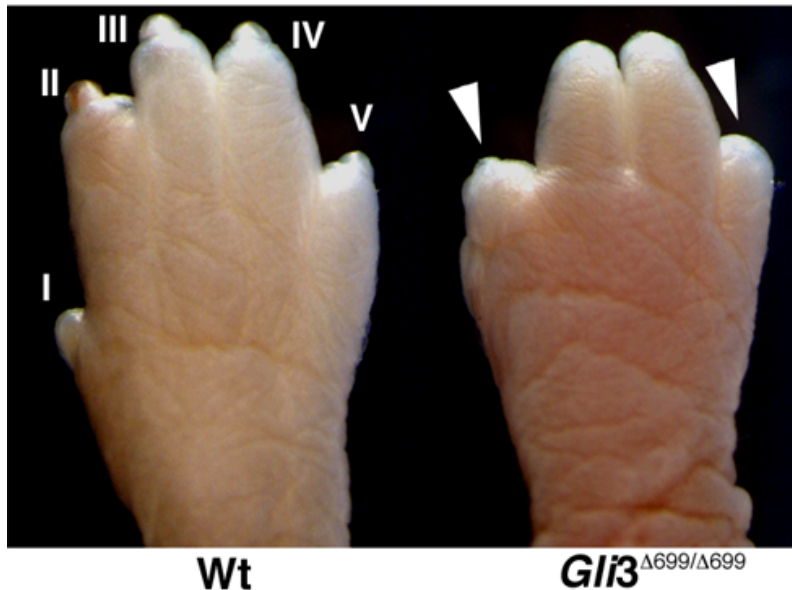


Abbildung 3.33: Nagel-Dysplasie in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 16,5). Gezeigt sind die Vordergliedmaßen eines Wildtyp- und eines homozygoten Embryos. Im Wildtyp sind die Finger (I-V) normal angelegt und haben deutlich erkennbare gut ausgebildete Nägel. In homozygoten Embryonen sind die Nägel überwiegend nicht ausgebildet (Pfeil; Finger V). In einigen wenigen Fällen sind sie jedoch

sehr schwach und stark verkürzt (Pfeil; Finger II). anterior – links; distal - oben

3.8.4 Untersuchung der inneren Organe

Während der äußerlichen phänotypischen Untersuchung von Neugeborenen und Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien, die homozygot für das *Gli3*^{Δ699}-Allel sind, fiel auf, daß diese unter einem imperforierten Anus leiden (Abb. 3.34). In diesen Tieren konnte zu keinem untersuchten Zeitpunkt (E 14,5-18,5 und Neugeborene) der Entwicklung die Ausbildung eines normalen perforierten Anus beobachtet werden. Unter den betroffenen Tieren konnten in 25% der Fälle eine Ausbildung des Anus gefunden werden. Hier war aber die Analmembran nicht durchbrochen und der Anus war somit verschlossen (Abb. 3.34 B). In den restlichen 75% der Tiere konnte weder die Ausbildung des Anus noch eine Perforation der Körperwand gefunden werden (Abb 3.34 C).

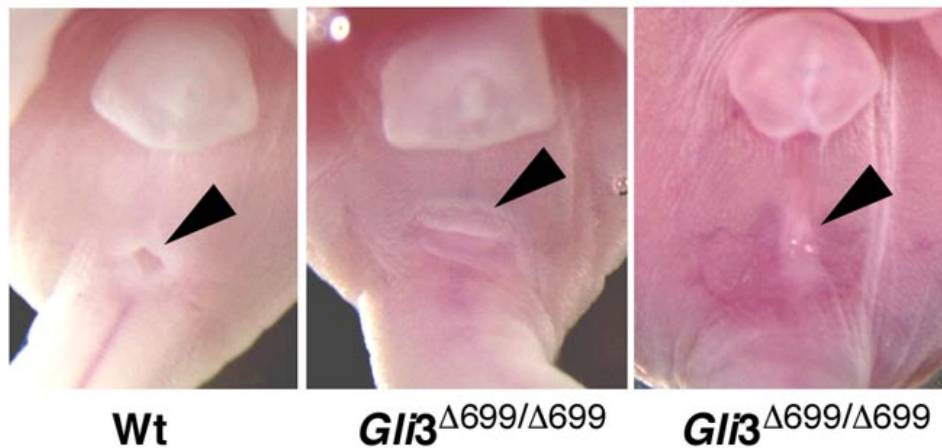


Abbildung 3.34: Imperforierter Anus in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Mutanten (E 18,5). Im Gegensatz zu dem im Wildtyp (A) ausgebildeten perforierten Anus (Pfeil) konnte in 25% der homozygoten Tiere nur eine Ausbildung ohne Perforation (B) und in 75% der homozygoten Tiere keinerlei Ausbildung eines Anus (C) gefunden werden.

Der Befund des imperforierten Anus deutete auf mögliche Probleme der Entwicklung des Gastrointestinaltrakts in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Tieren hin, da ein ähnlicher Zusammenhang in *Shh*- und *Ihh*-Mutanten beschrieben worden ist (RAMALHO-SANTOS, M. ET AL. 2000). Zur näheren Untersuchung der Anus-Fehlbildung und der möglichen Fehlbildungen des Gastrointestinaltrakts wurden zunächst die Eingeweide von Wildtyp- und *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Neugeborenen untersucht. Hierbei zeigte sich als erstes, daß der Magen der homozygoten Tiere im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren nicht mit Milch, sondern mit Luftblasen gefüllt war (Abb. 3.35).

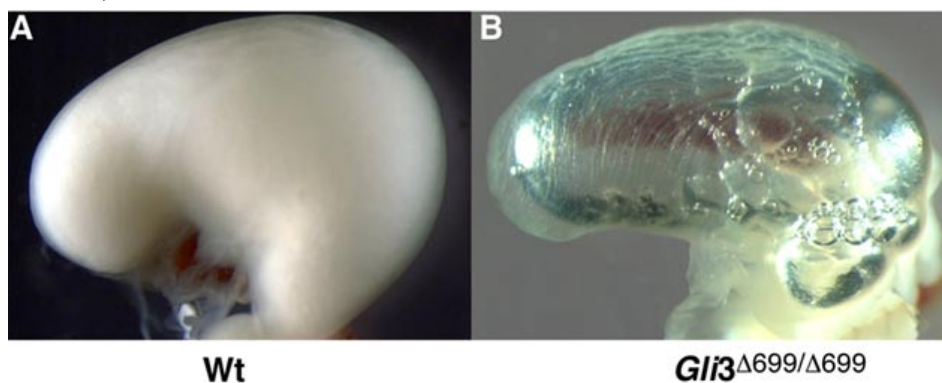


Abbildung 3.35: Vergleich der Mägen von Wildtyp- und *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Neugeborenen. Der Wildtyp-Magen (A) ist mit Milch gefüllt, wohingegen in dem Magen des *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Neugeborenen (B) nur Luftblasen zu finden sind.

Die nähere morphologische Untersuchung des Magen-Darm-Trakts von Neugeborenen und Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (E 14,5-18,5) ergab, daß die

Gesamtmorphologie des Magen-Darm-Trakts der homozygoten Mutanten gestört ist. Es fällt auf, daß der Darm insgesamt weniger stark gewunden ist als in Wildtyp-Tieren, die Oberfläche nicht glatt und gleichmäßig, sondern rauh erscheint und daß das Kolon und Rektum stark erweitert ist und blind in der Bauchhöhle endet. Hierbei wird keine Verbindung zu der Körperwand hergestellt und das Kolon bzw. Rektum ist verschlossen (Abb. 3.36).

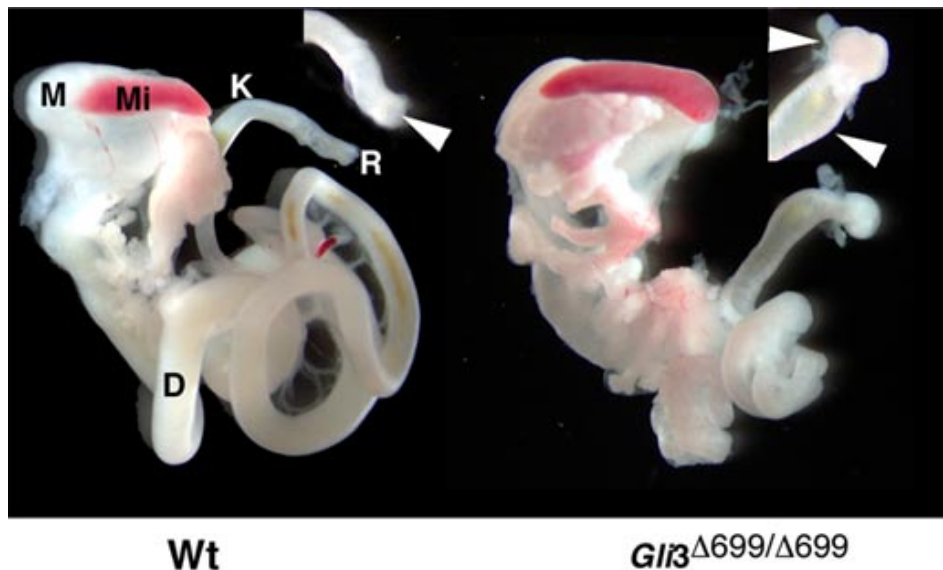


Abbildung 3.36: Morphologische Veränderungen des Gastrointestinaltrakts in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Tieren (E 17.5). Die auffälligste Veränderung in den homozygoten Mutanten ist das, in den Ausschnitten vergrößert gezeigte, verdickte Kolon und Rektum, das am Ende verschlossen in der Bauchhöhle endet und nicht wie in Wildtyp-Tieren mit dem Oberflächen-Ektoderm und dem Anus verbunden ist (Pfeile). D – Darm; K – Kolon; M – Magen; Mi – Milz; R - Rektum

Die nachfolgenden histologischen Untersuchungen konnten die ersten Befunde der Fehlbildungen des Gastrointestinaltraktes bestätigen und weitere Details der einzelnen Störungen aufzeigen. Die homozygoten Tiere zeigen ein verringertes Wachstum des Magenepithels, das somit dünner ist als in Wildtyp-Tieren (Abb 3.37 A). Außerdem kommt es zu einer massiven Erweiterung des Kolons und Rektums und einer gleichzeitigen Reduktion der Villi sowohl im Kolon und Rektum als auch im Darm (Abb 3.37 A und B). Weiterhin ließ sich die Verkürzung und die damit verbundene verringerte Anzahl der Windungen und die gestörte Anordnung in der Bauchhöhle des gesamten Gastrointestinaltrakts von Mutanten-Embryonen zeigen (Abb. 3.37B).

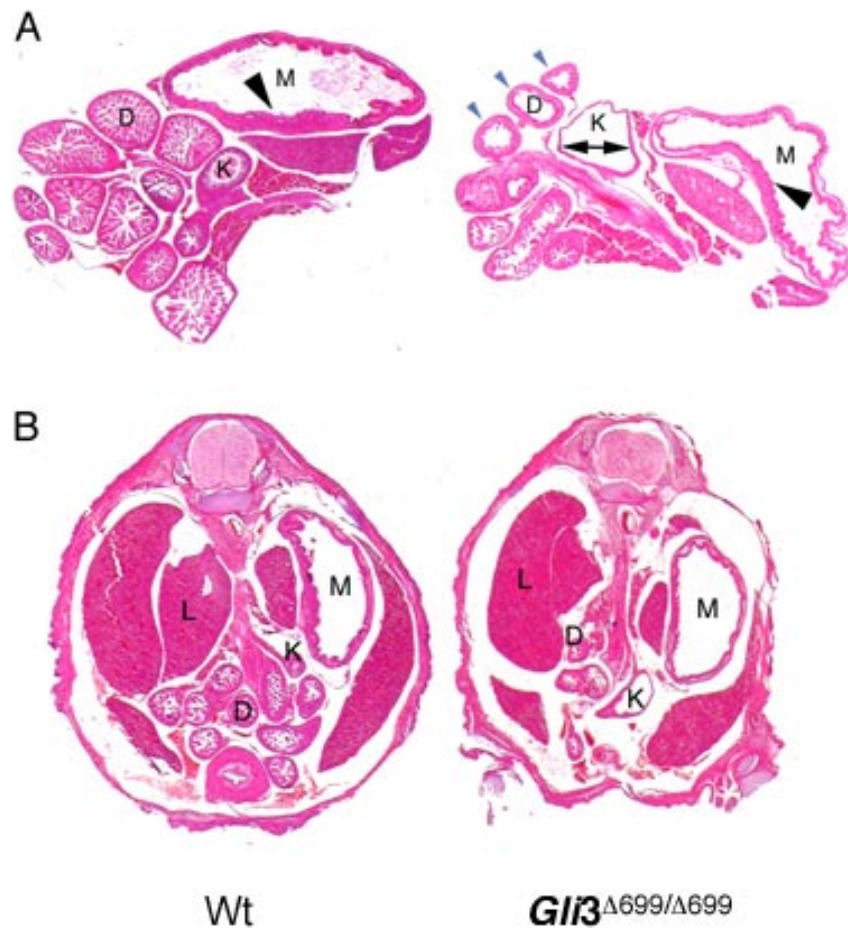


Abbildung 3.37: Histologische Untersuchung des Gastrointestinaltrakt-Phänotyps von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Tieren. Gezeigt sind Hämatoxylin/Eosin-gefärbte transverse Paraffin-Dünnschnitte eines isolierten Gastrointestinaltrakts (A) bzw. Schnitte durch die Bauchhöhle (B) eines Embryos. (A) Die homozygoten Mutanten (E 17,5) zeigen eine massive Erweiterung des Kolons bzw. des Rektums (Doppelpfeil) verbunden mit einem Verlust der auskleidenden Villi und einer abnormal dünnen Wandung. Eine Reduktion der Villi ist außerdem deutlich in weiten Teilen des Darms zu erkennen (blaue Pfeile). Zusätzlich hierzu zeigt sich eine Verdünnung des Magenepithels in homozygoten Tieren (Pfeil). (B) Transverse Schnitte von Wildtyp- und Mutanten-Embryonen (E 15,5) zeigen neben den bereits beschriebenen Veränderungen des Magens, Darms und des Kolons und Rektums eine deutliche Abnahme der Windungsanzahl des Darms sowie eine gestörte Anordnung des Gastrointestinaltrakts in der Bauchhöhle der homozygoten Tiere. D - Darm; K – Kolon/Rektum; L – Leber; M – Magen

Aufgrund der bereits erwähnten phänotypischen Ähnlichkeiten zu *Shh*- und *Ihh*-Mausmutanten (RAMALHO-SANTOS, M. ET AL. 2000) und der beschriebenen zentralen Rolle von *Shh* während der Spezifizierung des Gastrointestinaltrakts im Huhn und in der Maus (APELQVIST, A. ET AL. 1997; ROBERTS, D.J. ET AL. 1998; SUKEGAWA, A. ET AL. 2000) wurde die *Shh*-Expression untersucht (Daten nicht gezeigt). Hierbei ergaben sich

zum untersuchten Zeitpunkt (E 9,5) keine Unterschiede in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen zum beschriebenen Wildtyp-Expressionsmuster (ECHELARD, Y. ET AL. 1993).

Die weitere systematische Untersuchung der inneren Organe an histologischen Präparaten ergab, daß in den homozygoten *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Tieren eine Fehlbildung des Kehlkopfes vorliegt. In diesen Tieren wird der Kehldeckel im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren nicht ausgebildet und es kommt zu pathologischen Veränderungen des Kehlkopfes. Hierzu zählt vorallem die Ausbildung eines Durchbruches zwischen Ösophagus und Larynx in den Mutanten sowie der vollständige Verlust der normalen Kehlkopf-Morphologie im Bereich des Larynx bzw. im Bereich der Stimmbänder (Abb. 3.38).

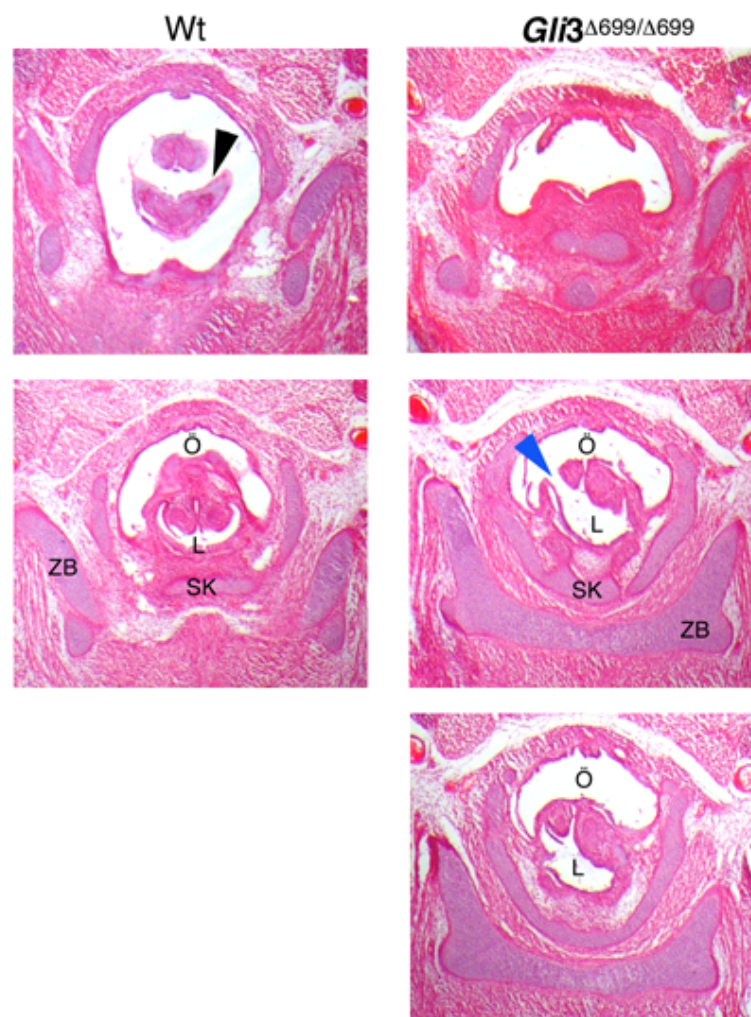


Abbildung 3.38: Kehlkopf-Fehlbildungen in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Mutanten (E 15,5). Neben dem Fehlen des im Wildtyp deutlich zu erkennenden Kehldeckels (schwarzer Pfeil) ist besonders die pathologische Morphologie des Kehlkopfes auffällig. Neben den Veränderungen im Bereich des Larynx ist weiterhin die Ausbildung eines Spalts (blauer Pfeil) zwischen Ösophagus und Larynx in den homozygoten Tieren zu finden. L – Larynx; Ö – Ösophagus; SK – Schildknorpel; ZB - Zungenbein

In den tieferen Bereichen (kaudal) ist die normale Trennung zwischen Trachea und Ösophagus jedoch erhalten. Im Gegensatz zu den gefundenen Fehlbildungen der oberen Atemwege und des Verdauungstraktes konnten im Bereich des Brustkorbes keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen in der Mutante festgestellt werden. Die Lunge zeigt eine normale Größe und Aufteilung und der ventrikuläre Bereich des Herzens zeigt keine offensichtlichen Auffälligkeiten. Außerdem kommt es zu einer normalen Ausbildung des Thymus in den homozygoten Tieren (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zu den deutlichen Veränderungen des Gastrointestinaltrakts zeigt auch das Urogenitalsystem schwere Störungen der normalen Entwicklung in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren. In den untersuchten histologischen Präparaten zeigte sich, daß in diesen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren die Entwicklung der Nieren und der mit ihnen assoziierten Nebennieren schwer betroffen ist. Während der Embryonalentwicklung kommt es in den homozygoten Embryonen zu einem unilateralen Verlust der Niere und zu einem uni- oder bilateralen Verlust der Nebenniere. Wenn vorhanden, ist die Nebenniere in ihrer Größe stark verringert und die einseitig ausgebildete Niere weist neben einer deutlichen Verkleinerung auch morphologische Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen auf (Abb. 3.39).

Um zu untersuchen, ob die in den späten Embryonalstadien gefundenen Fehlbildungen des Urogenitalsystems auf eine gestörte Spezifizierung und Entwicklung (Dysplasie) oder auf ein vollständiges Fehlen der Anlage der Struktur (Agenesie) zurückzuführen sind, wurden weitergehende molekulare und histologische Untersuchungen durchgeführt. Durch „Whole-mount“- *in situ* Hybridisierungen mit *Dkk1*, das zum untersuchten Zeitpunkt (E 10,5) unter anderem in den mesonephrischen Tubuli und den mesonephrischen Gängen exprimiert ist, und durch die vergleichende Untersuchung von Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Paraffin-Dünnschnitten von Wildtyp- und homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen (E 11,5) konnte gezeigt werden, daß die mesonephrischen Tubuli und sowohl die meso- wie auch die metanephrischen Gänge während der Embryonalentwicklung paarig angelegt werden (Abb.3.40). Die paarige Anlage der metanephrischen Gänge und des metanephrischen Blastems, das für die normale Entwicklung der Nieren von zentraler Bedeutung ist, läßt somit auf eine Störung der Spezifizierung und Entwicklung der Nieren schließen (Dysplasie), die zu den beobachteten Veränderungen in den *Gli3*^{Δ699}-homozygoten Embryonen führt.

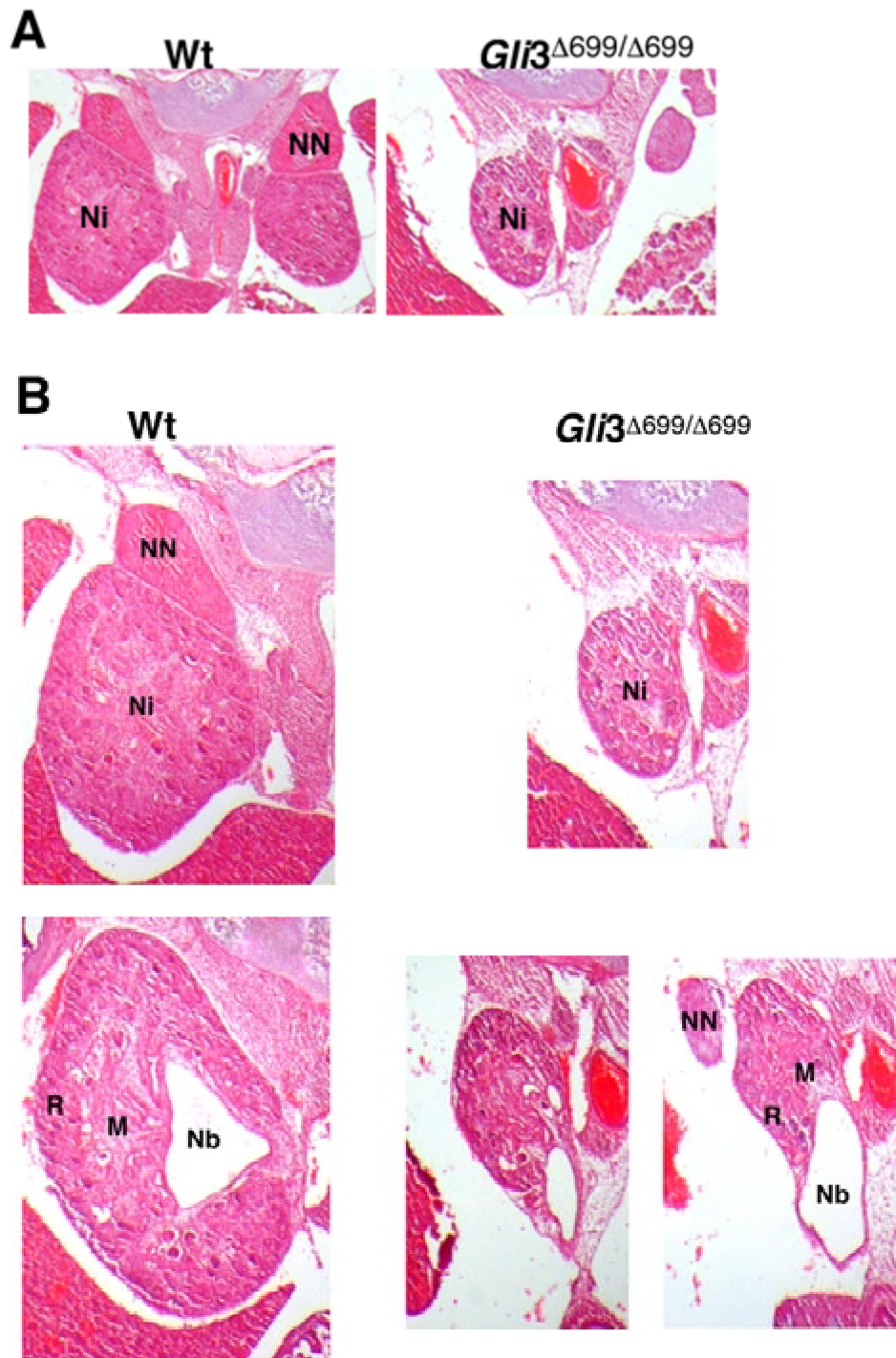


Abbildung 3.39: Störungen der Nieren- und Nebennieren-Entwicklung in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 15,5). (A) Die unvollständige Ausbildung der paarig angelegten Nieren und Nebennieren ist in den *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen deutlich zu erkennen. (B) Die mit der gleichen Vergrößerung aufgenommenen Bilder zeigen die Größenreduktion der Niere homozygoter Tiere. Neben der Größenreduktion sind deutlich die morphologischen Veränderungen zu erkennen. So ist z.B. die Trennung in Rinde und Mark undeutlicher als in Wildtyp-Embryonen und das Nierenbecken weicht in seiner Ausbildung und Position deutlich vom Wildtyp ab. Außerdem ist die Nebenniere verkleinert und ebenfalls falsch positioniert. Nb – Nierenbecken; Ni – Niere; NN – Nebenniere; M – Mark; R – Rinde

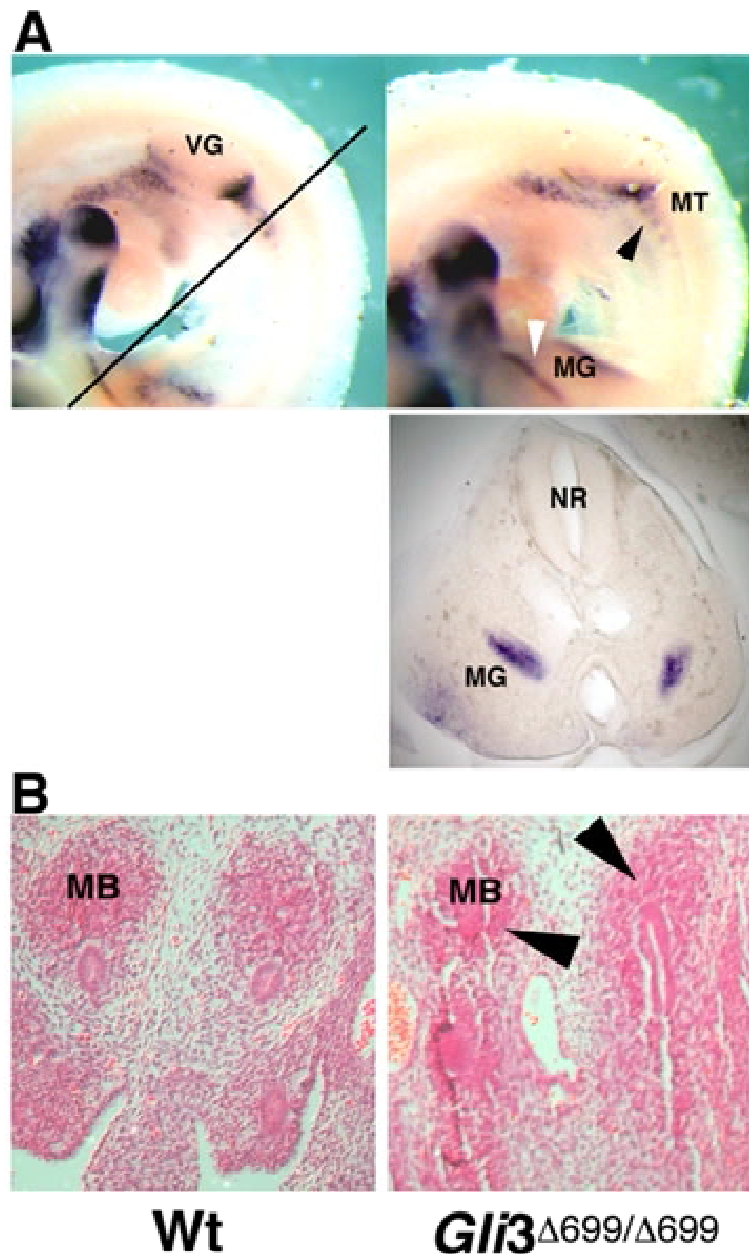


Abbildung 3.40: Paarige Ausbildung der mesonephrischen Tubuli und der mesonephrischen und metanephrischen Gänge während der Embryonalentwicklung von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen. (A) *In situ*-Hybridisierungen mit *Dkk1* und 100 µm Vibratomschnitte (die Schnittführung in den Embryonen ist durch die Linie angedeutet) dieser Embryonen zeigen, daß sowohl die mesonephrischen Tubuli (schwarzer Pfeil) als auch die mesonephrischen Gänge (weißer Pfeil) paarig angelegt werden (E 10,5). (B) Vergleichende histologische Analysen transverser Hämatoxylin/Eosin-gefärbter Paraffin-Dünnschnitte im Bereich des sich entwickelnden Urogenitalsystems von Wildtyp- und *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 11,5) zeigen die paarige Anlage des metanephrischen Blastems (Pfeile) während der Entwicklung. MB – metanephrisches Blastem; MG – mesonephrischer Gang; MT – mesonephrische Tubuli; NR – Neuralrohr

Beim Menschen gibt es einen häufig gefundenen Zusammenhang zwischen Entwicklungs- und Differenzierungsstörungen der Nebennieren und Fehlbildungen der Hypophyse (OPITZ, J.M. UND HOWE, J.J. 1967; RIMOIN, D. UND SCHIMKE, R. 1971; LANES, R. ET AL. 1978; SIPPONEN, P. ET AL. 1978). Deshalb wurde in homozygoten Embryonen die Hypophyse auf morphologische Veränderungen untersucht. Hierbei konnten jedoch keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen festgestellt werden, die auf eine Störung der normalen Entwicklung der Hypophyse hingedeutet hätten (Abb. 3.41).

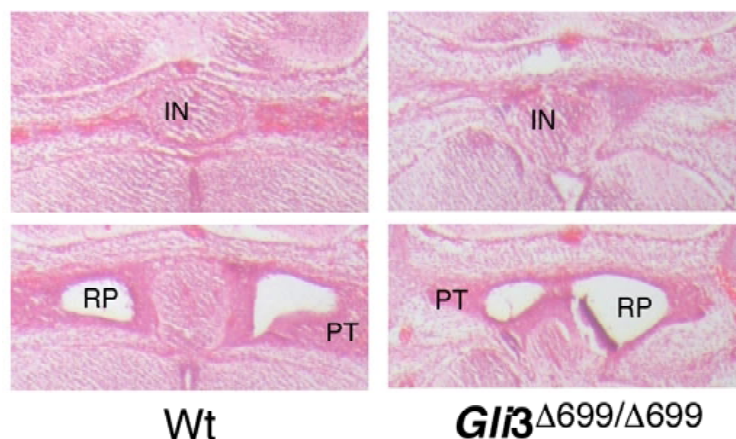


Abbildung 3.41: Morphologische Untersuchung der Hypophyse in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen (E 15,5). Trotz der beobachteten schweren Fehlbildungen bzw. der Abwesenheit der Nebennieren konnten keine morphologischen Veränderungen der Hypophyse festgestellt werden. IN – Infundibulum der Hypophyse; PT – Pars Tuberalis; RP – Rathke's Pouch

3.8.5 Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems

Aufgrund der beobachteten Störungen der Entwicklung des ZNS in *Xt^l*-Mäusen (siehe 1.2.3; THEIL, T. ET AL. 1999) wurden homozygote *Gli3*^{Δ699}-Embryonen einer ersten morphologischen Untersuchung unterzogen. Hierbei konnten in den analysierten Embryonalstadien (E 12,5 und 15,5) keine auffälligen Veränderungen des Gehirns gefunden werden. Im Gegensatz zu den beschriebenen Veränderungen in *Xt^l*-Mäusen sind sowohl die Hippocampus-Anlage als auch die Anlage des Choroid plexus (Abb 3.42) in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen vorhanden. Die Untersuchung des programmierten Zelltods im ZNS (E 11,5; 12,5; 15,5) zeigte ebenfalls keinerlei Veränderungen zwischen Wildtyp- und homozygoten Embryonen

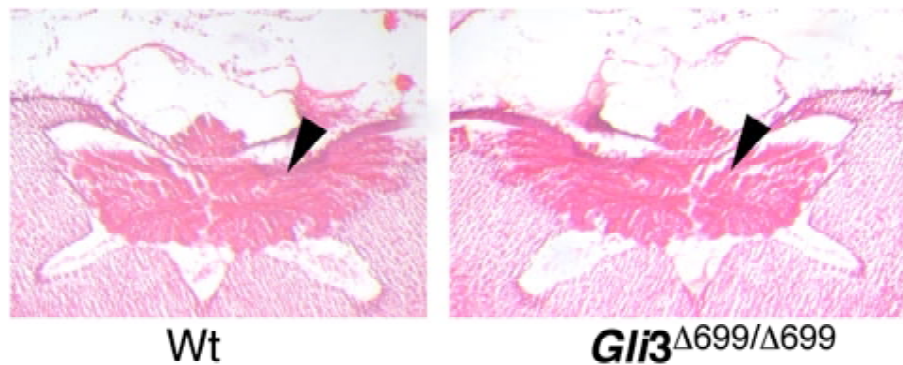


Abbildung 3.42: Ausbildung des Choroid plexus in $Gli3^{\Delta699/\Delta699}$ -Embryonen (E 15,5). Die vergleichende morphologische Untersuchung zeigt, daß in Wildtyp- und $Gli3^{\Delta699/\Delta699}$ -Embryonen der Choroid plexus (Pfeil) normal angelegt wird.

Die Neurogenese des ventralen Neuralrohres ist in hohem Maße von der Aktivität von sekretierten Shh abhängig. Es wird vom Notochord- und Grundplatten-Zellen produziert und sekretiert (CHIANG, C. ET AL. 1996; ERICSON, J. ET AL. 1996; 1997). Nach seiner Sekretion wirkt Shh schließlich in einem Gradient über weite Entfernungen als Morphogen auf die Musterbildung des Neuralrohres ein (BRISCOE, J. ET AL. 2001). Um einen ersten Eindruck über mögliche Störungen der Entwicklung des ventralen Neuralrohres in homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Embryonen zu bekommen wurde die mRNA-Expression von *Shh* im Notochord und der Grundplatte untersucht (Abb. 3.43). Hierbei konnten jedoch keine Veränderungen der mRNA-Expression festgestellt werden. Die weitere detaillierte Analyse des ventralen Neuralrohres von homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Embryonen auf mögliche Störungen der Entwicklung und Differenzierung einzelner Zellpopulationen werden in Kooperation mit Dr. James Briscoe; Div. of Developmental Neurobiology; NIMR; London durchgeführt.

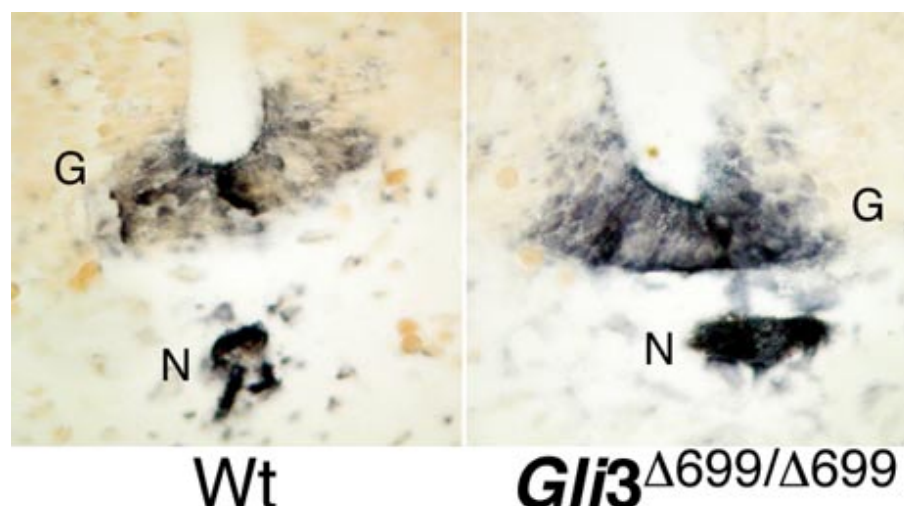


Abbildung 3.43: Expressionsanalyse von *Shh* in Wildtyp- und $Gli3^{\Delta699/\Delta699}$ -Embryonen (E 11,5). Es lassen sich keine Unterschiede in der Expression von *Shh* im Notochord oder der Grundplatte zwischen den beiden Genotypen erkennen. N – Notochord; G - Grundplatte

Zusätzlich wurde die Expression der mittleren Untereinheit (165 kDa) des Neurofilaments untersucht. Das Neurofilament stellt den größten Anteil des Zytoskeletts von großen Neuronen und myelinisierten Axonen, besonders der unteren und oberen motorischen und sensorischen Neurone, dar. Im Menschen sind abnormale Ansammlungen des Neurofilaments mit einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen verbunden. Hier und auch in der Maus zeigt sich, daß diese Abnormalitäten des Neurofilaments zur selektiven Degeneration und zum Absterben von Motorneuronen führen kann (Übersicht bei CAPANO, C.P. ET AL. 2001). Die Untersuchung der Expression der mittleren Untereinheit des Neurofilaments (siehe 2.16) in Embryonalstadien (E10,5-11,5) ergab keine offensichtlichen Veränderungen in den homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen (Abb. 3.44).

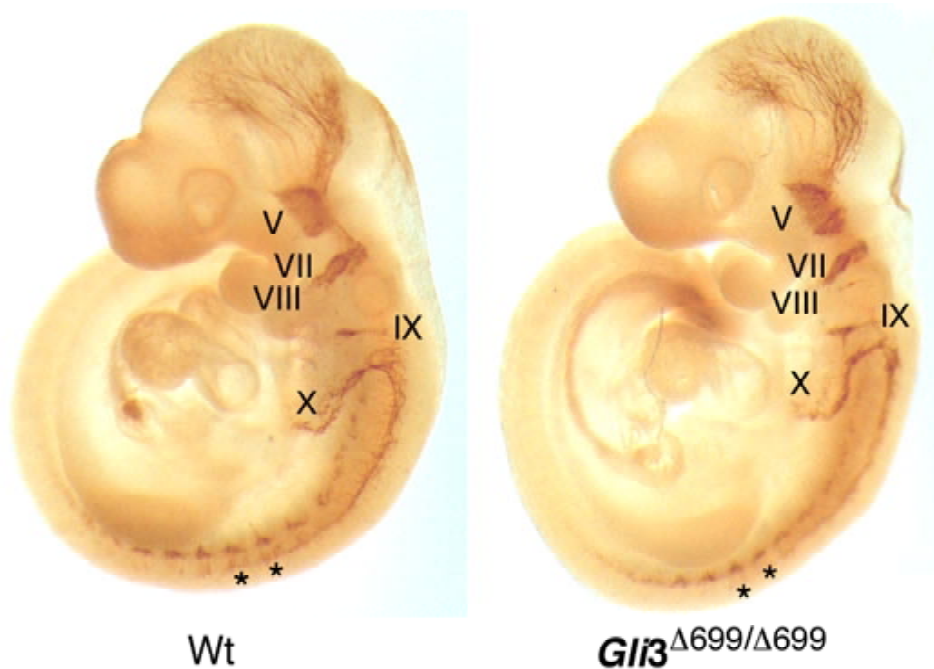


Abbildung 3.44: Anfärbung der Neurone in Wildtyp- und *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 10,5). Nach der Sichtbarmachung der Neurone durch „Whole Mount“-Immunohistochemie mit dem Antikörper 2H3 (siehe 2.16) lassen sich keine Abnormalitäten der Anordnung der Neurone in homozygoten Tieren erkennen. V – trigeminal Ganglien; VII/VIII – facialer und vestibulocochlearer Nerv; IX – glossopharyngealer Nerv; X - Vagus; * - dorsale Wurzelganglien

3.9 Vergleichende phänotypische Untersuchung von $Gli3^{\Delta699/\Delta699}$ - und $Gli3^{XtJ/\Delta699}$ -Embryonen

Zusätzlich zu der Analyse der homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Tiere wurden auch die Auswirkungen der Koexistenz des $Gli3^{\Delta699}$ - und des $Gli3^{XtJ}$ -Allels auf die Entwicklung untersucht. Hierdurch sollte zum Einen untersucht werden, ob es für die Manifestation der nur in homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Embryonen gefundenen schweren Entwicklungsstörungen ausreichend ist, im heterozygoten Zustand des $Gli3^{\Delta699}$ -Allels die Menge an gleichzeitig vorhandenem $Gli3^{Wt}$ -Protein zu reduzieren bzw. dieses zu entfernen. Zum Anderen sollte die Frage untersucht werden, ob es nicht das Verhältnis zum Wildtyp-Protein, sondern die absolute Menge an gebildetem $Gli3^{\Delta699}$ -Protein ist, die für die Ausbildung des phänotypischen Spektrums verantwortlich ist. Hierzu wurden heterozygote $Gli3^{\Delta699}$ -Tiere und heterozygote $Gli3^{XtJ}$ -Tiere verpaart und die erhaltenen Neugeborenen bzw. Embryonalstadien entsprechend der für das $Gli3^{\Delta699}$ -Allel (siehe 3.5) und das $Gli3^{XtJ}$ -Allel (BÜSCHER, D. ET AL. 1998) beschriebenen PCR-basierenden Strategie genotypisiert. Es zeigte sich, daß der $Gli3^{\Delta699/XtJ}$ -Genotyp neonatal letal war und die Tiere innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Geburt gestorben sind. Die phänotypische Analyse der Neugeborenen und verschiedener Embryonalstadien ergab, daß die $Gli3^{\Delta699/XtJ}$ -Embryonen einen imperforierten Anus aufweisen. Die Ausprägung des imperforierten Anus entsprach der in Abbildung 3.34 (B) dargestellten, die in 25% der homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Tiere gefunden werden konnte. Eine weitere Auffälligkeit der sonst normal erscheinenden $Gli3^{\Delta699/XtJ}$ -Tiere war das Auftreten einer präaxialen Polydaktylie, die in ihrer Ausprägung der in heterozygoten Xt^J -Mäusen (siehe 1.2.3) beobachteten entsprach. Die detaillierte Analyse des Extremitätenskeletts der $Gli3^{\Delta699/XtJ}$ -Tiere ergab, daß die zusätzlichen Finger in diesen Tieren nur präaxial ausgebildet werden und es keine weiteren Veränderungen im Bereich des zentralen Autopods wie in $Gli3^{\Delta699}$ -Tieren gibt. Außerdem konnte keine proximo-distale Verkürzung oder eine Verbiegung der Röhrenknochen des Extremitätenskeletts der $Gli3^{\Delta699/XtJ}$ -Tiere beobachtet werden (Vergleich Abb. 3.28 und Abb. 3.45). In diesem Zusammenhang fiel auf, daß einige der aus den durchgeführten Kreuzungen erhaltenen heterozygoten Xt^J -Tiere eine postaxiale Polydaktylie aufwiesen, die der in Abbildung 3.17 für heterozygote $Gli3^{\Delta699}$ -Tiere dargestellten entsprach. Eine weitergehende Untersuchung konnte zeigen, daß das Auftreten einer postaxialen Polydaktylie nicht nur in diesen beiden Tiergruppen, sondern auch in homozygoten Xt^J -Tieren (n=7/8) beobachtet werden kann (Abb. 3.46).

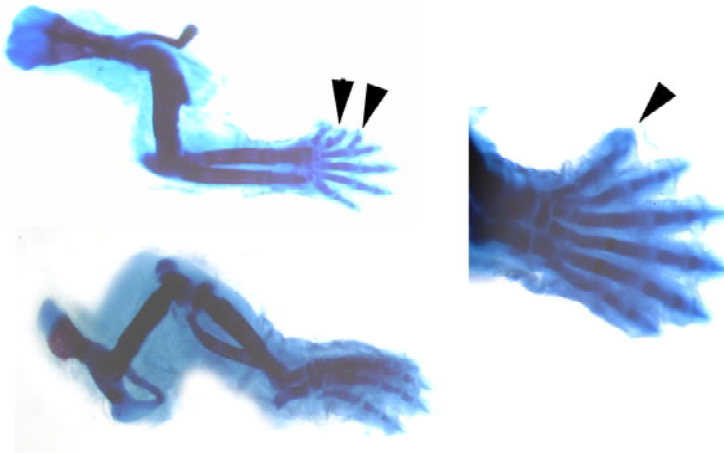


Abbildung 3.45: Gliedmaßen-Phänotyp der $Gli3^{\Delta 699/XtJ}$ -Mutanten. Knochenvorläufer-Färbungen des Gliedmaßen-Skeletts von $Gli3^{\Delta 699/XtJ}$ -Embryonen (E 17,5). Die Extremitäten zeigen außer einer deutlich ausgeprägten präaxialen Polydaktylie (Pfeil) keine weiteren auffälligen Veränderungen.

Die weitere Untersuchung des Skeletts von $Gli3^{\Delta 699/XtJ}$ -Tieren ergab keine auffälligen Veränderungen. So konnte in diesen Tieren auch nicht die in homozygoten $Gli3^{\Delta 699}$ -Embryonen beobachtete vorzeitige Verknöcherung der Wirbelkörper und die Verschmelzung benachbarter Wirbel beobachtet werden (Vergleich Abb. 3.26 und Abb. 3.47).

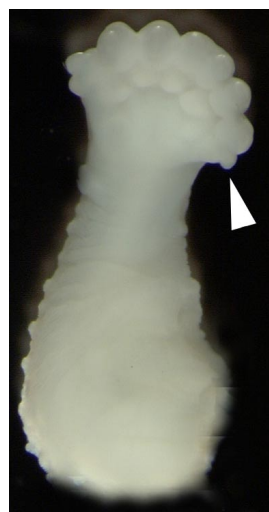


Abbildung 3.46: Postaxiale Polydaktylie in homozygoten Xt^J -Embryonen (E 17,5). Die zusätzlich ausgebildete Struktur ist deutlich auf der posterioren Seite der Hinterextremität zu erkennen (Pfeil).

Aufgrund der beobachteten Störungen der Kehlkopfentwicklung, des Gastrointestinaltrakts und der Nieren sowie Nebennieren in homozygoten $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutanten, wurden die $Gli3^{\Delta 699/XtJ}$ -Embryonen einer detaillierten histologischen Analyse unterzogen. Hierbei zeigte sich, daß die in homozygoten $Gli3^{\Delta 699}$ -Embryonen gefundenen schwere Entwicklungsstörungen dieser Strukturen in $Gli3^{\Delta 699/XtJ}$ -Embryonen nicht vorliegen (Vergleich Abb. 3.37; 3.38; 3.39 und Abb. 3.48).

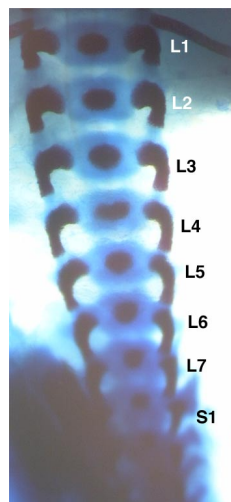


Abbildung 3.47: Untersuchung der Wirbelsäule von *Gli3*^{Δ699/XtJ}-Mutanten (E 17,5). Die einzelnen Wirbel zeigen eine normale Morphologie und Entwicklung. Die in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen beobachteten Veränderungen im Bereich der lumbalen und sakralen Wirbel sind hier nicht zu erkennen.

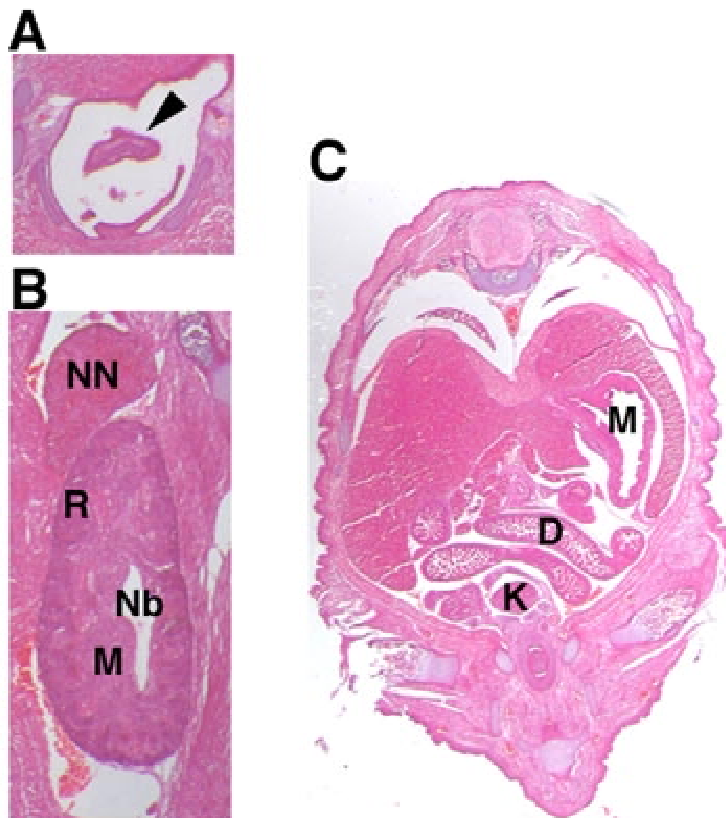


Abbildung 3.48: Histologische Untersuchung von *Gli3*^{Δ699/XtJ}-Embryonen (E 15,5). Die vergleichende Untersuchung der Hämatoxylin / Eosin - gefärbten Paraffindünnschnitte läßt keine morphologischen Veränderungen des Kehldeckels (Pfeil) (A), der Nieren und Nebennieren; NN – Nebenniere; R – Rinde; M – Mark; Nb - Nierenbecken (B) oder des Gastrointestinaltrakts; D – Darm; M – Magen; K – Kolon/Rektum (C) erkennen. In den *Gli3*^{Δ699/XtJ}-Embryonen zeigen die entsprechenden Strukturen eine Wildtyp-Embryonen entsprechende Morphologie.

Zusätzlich hierzu konnte gezeigt werden, daß in homozygoten *Xt^l*-Embryonen ebenfalls keine Störungen der Entwicklung der Niere, der Nebenniere, des Gastrointestinaltrakts sowie des Kehlkopfes vorliegen (Daten nicht gezeigt).

	<i>Gli3</i> ^{Δ699/Δ699}	<i>Gli3</i> ^{Δ699/XtJ}	<i>Gli3</i> ^{XtJ/XtJ}
	zentral	präaxial	präaxial
Polydaktylie			
Syndaktylie	+	-	(+)
Dysplasie der Nägel	+	-	-
Fehlbildungen der Wirbelsäule	+	-	(-)
imperforierter Anus	+	+	-
Fehlbildungen des Gastrointestinaltrakts	+	-	-
Fehlbildungen des Kehlkopfes	+	-	-
Fehlbildungen der Nieren und Nebennieren	+	-	-
Letalität	+	+	+

Tabelle 8: Vergleich der phänotypischen Veränderungen von homozygoten *Gli3*^{Δ699}-, *Gli3*^{Δ699/XtJ}- und *Gli3*^{XtJ/XtJ}-Tieren.

3.10 Zusammenfassung der beobachteten phänotypischen Veränderungen und vergleichende Betrachtung der beschriebenen Veränderungen in *Gli3*^{Δ699}-Mäusen und Pallister-Hall Syndrom-Patienten

Die heterozygoten *Gli3*^{Δ699/+}-Tiere zeigten außer einer mit sehr geringer Frequenz (3%) auftretender postaxialer Polydaktylie keine weiteren äußerlichen Veränderungen oder Auffälligkeiten der inneren Organe. Ferner sind sie fertil, haben eine normale Lebenserwartung und zeigen keine Verhaltensauffälligkeiten. Im Gegensatz dazu können in den homozygoten Tieren eine Vielzahl von zum Teil schwerwiegenden Störungen der normalen Mausentwicklung gefunden werden. Diese Fehlbildungen führen zu einer neonatalen Letalität der homozygoten Tiere innerhalb der ersten 12 Stunden nach ihrer Geburt. Hierbei zeigen sich neben einer Vielzahl von schwerwiegenden Veränderungen der inneren Organe auch Veränderungen des Skeletts. Hierunter sind Veränderungen des kranialen und axialen Skeletts sowie starke Veränderungen des Extremitätenskeletts zu finden. Bei den inneren Organen sind sowohl der Gastrointestinaltrakt, der Anus, die Nieren und Nebennieren sowie die oberen Atemwege (Kehlkopf) von der Mutation betroffen. Die einzelnen Phänotypen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Genotyp	Phänotyp	n
<i>Gli3</i> ^{Δ699/+}	postaxiale Polydaktylie	8/237
<i>Gli3</i> ^{Δ699/Δ699}	neonatale Letalität	7/7
	intrauterine Wachstumsverzögerung	48/53
	zentrale Polydaktylie	23/23
	proximo-distale Verkürzung der Extremitäten	23/23
	Verbiegung der Röhrenknochen	9/9
	verzögerte Mineralisierung der distalen Extremitäten	9/9
	Syndaktylie	23/23
	Dysplasie der Nägel	21/23
	vorzeitige Verknöcherung der Wirbelsäule und	4/4
	Verschmelzung benachbarter Wirbel	
	Fehlbildungen der Schädelbasisknochen	3/4
	Ansatz einer Kiefer-Gaumen Spalte	3/4
	imperforierter Anus	28/28
	Fehlbildungen des Gastrointestinaltraktes	11/11
	fehlender Kehldeckel	4/4
	Kehlkopffehlbildungen	4/4
	Hypoplasie und Dysplasie der Nieren	7/7
	Hypoplasie und Dysplasie der Nebennieren	4/4

Tabelle 9: Zusammenfassung der in *Gli3*^{Δ699}-Tieren beobachteten phänotypischen Veränderungen und die Häufigkeit ihres Auftretens.

Die in den homozygoten Tieren beschriebenen Veränderungen finden in weiten Bereichen eine Entsprechung unter den in PHS-Patienten gefundenen klinischen Störungen. Die Gegenüberstellung der in den Patienten als Hauptmerkmale (BIESECKER, L.G. UND GRAHAM, J.M. JR. 1996) des Pallister-Hall Syndroms beschriebenen Störungen (siehe 1.2.4) und den in den homozygoten Mäusen gefundenen Störungen der normalen Entwicklung deuten darauf hin, daß die homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren eine Phänokopie des Pallister-Hall Syndroms darstellen (Tab. 10). Somit können diese Tiere als ein Mausmodell

für die menschliche Fehlbildungserkrankung angesehen werden und ermöglichen eine detaillierte phänotypische sowie molekulare Untersuchung der Konsequenzen der eingebrachten *Gli3*-Mutation.

		<i>Gli3</i> ^{Δ699/Δ699}	PHS
Gliedmaßen	Polydaktylie	+	+
	Syndaktylie	+	+
	Dysplasie der Nägel	+	+
obere Atemwege	gespaltener/fehlender Kehldeckel	+	+
	Kehlkopffehlbildungen	+	+
endokrine Strukturen	Hypophysenrückbildung/ -unterfunktion	?	+
Eingeweide	imperforierter Anus	+	+
	Fehlbildungen des Gastrointestinaltrakts	+	(+)
	Nierenanomalien	+	+
	Nebennierenanomalien	+	+
ZNS	Hypothalamische Hamartoma	-	+
Letalität		+	(+)

Tabelle 10: Vergleich der Phänotypen zwischen Pallister-Hall Syndrom Patienten und *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Mäusen.

Neben diesen hier nur dargestellten Hauptmerkmalen, unter denen ein hohes Maß an Übereinstimmung gefunden werden konnte zwischen PHS-Patienten und *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Mäusen, gibt es noch eine Vielzahl weiterer kleinerer Übereinstimmungen wie z.B. der verzögerten Verknöcherung der distalen Gliedmaßelemente oder den Veränderungen der Schädelform, die hier nicht im Einzelnen aufgelistet sind, sich aber aus dem Vergleich von Abschnitt 1.2.4 und 3.8 bzw. Tabelle 9 ergeben.

4 Diskussion

Zum Verständnis der Pathomechanismen menschlicher Fehlbildungserkrankungen sind tierische Modellsysteme von entscheidender Wichtigkeit. Eine besondere Stellung nimmt hierbei die Maus ein, da die gerichtete Veränderung des Mausgenoms und das Einbringen von gezielten Mutationen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eine Vielzahl von Manipulationen ermöglicht. Durch die Techniken der reversen Genetik ist es somit möglich, im Menschen identifizierte Veränderungen eines Gens oder Chromosomenabschnitts nachzustellen. In einer Vielzahl von Fällen kann dadurch eine Kopie des im Menschen beobachteten Phänotyps in der Maus erreicht werden und eine detaillierte morphologische aber vorallem molekulare Untersuchung der einzelnen beobachteten phänotypischen Veränderungen durchgeführt werden (Übersicht bei BEDELL, M.A., ET AL. 1997B). Diese Analysen können sowohl im adulten Tier als auch während der Embryonalentwicklung vorgenommen werden. Hierdurch können die einzelnen während der Entwicklung der Erkrankung ablaufenden Prozesse besser verstanden werden und die Untersuchung der molekularen Veränderungen in den Mutanten kann zum Verständnis der molekularen Mechanismen und genetischen Netzwerke beitragen, die der Entwicklung der einzelnen betroffenen Organe und Strukturen zu Grunde liegen.

Im Menschen sind zur Zeit 25 verschiedene *GLI3*-Mutationen (ohne Translokationen) bekannt, die zu vier verschiedenen phänotypischen Ausprägungen führen. Unter diesen sind zwei Syndrome mit einer Vielzahl von verschiedenen Entwicklungsstörungen und zwei Fehlbildungserkrankungen, die sich nur auf die Gliedmaßen begrenzen. Neben den schwerwiegenden Störungen in den beiden Syndromen, ist in der Gesamtheit der mit *GLI3* verbundenen Phänotypen auffällig, daß qualitativ unterschiedliche Formen der Polydaktylie in den einzelnen Patientengruppen zu beobachten sind. Hier finden sich neben einer präaxialen auch eine zentrale, sowie eine postaxiale Polydaktylie. Im deutlichen Gegensatz hierzu finden sich in den unterschiedlichen *Gli3*-Mutanten der Maus (*Xt^H*, *Xt^J*, *Pdn*, *add*), die zu einer Reduktion der *Gli3*-Expression oder zu einem Verlust der DNA-bindenden Domäne führen, nur präaxiale Polydaktylien (Übersicht bei THEIL, T ET AL. 1999B). Weiterhin auffällig ist, daß sich die Mutationen, die im Menschen zu einer zentralen oder postaxialen Polydaktylie führen, auf die Region 3' der Zink-Finger des *GLI3*-Gens begrenzen lassen. Hier wirft sich die Frage nach einer potentiellen Struktur-Funktionsbeziehung des *GLI3*-Proteins auf und zusätzlich hierzu eine mögliche Korrelation des jeweils beobachteten Phänotyps mit einem zugrundeliegenden Genotyp. In

diesem Zusammenhang sollten die im Menschen identifizierten PHS (KANG, S. ET AL. 1997) und PAP-A (RADHAKRISHNA, U. ET AL. 1997B) Mutationen in das *Gli3*-Gen der Maus eingebracht werden. Zusätzlich hierzu sollte eine zwischen diesen beiden liegende Mutation eingefügt werden. Hierbei handelte es sich nicht wie bei den beiden anderen Mutationen um das Einbringen einer Leserastermutation in das *Gli3*-Gen, sondern um die Insertion einer Selektionsmarker-Kassette in das Exon n-1. Hierdurch sollte die kodierende Sequenz unterbrochen werden und ein Proteinabbruch herbeigeführt werden. Die Durchführung dieses Ansatzes als Vorexperiment erschien angebracht, da wie bereits erwähnt bis zu diesem Zeitpunkt nur *Gli3*-Mutationen in der Maus bekannt waren, die zu einer präaxialen Polydaktylie führen, so daß sich die Frage stellte, ob eine andere Form der Polydaktylie in der Maus hervorgerufen werden kann.

Neben der Etablierung der ES-Zelllinien, die die im Menschen gefundenen Leserastermutationen an Position 2194 (delG – PHS) und 2463 (delA – PAP-A) tragen, konnten die Zellen mit inserierter Selektionsmarker-Kassette (*neo/tk*) an Position 2402 isoliert werden. Diese *Gli3*^{neo/tk}-ES-Zellen konnten weiterhin erfolgreich zur Generierung von chimären Mäusen und schließlich zur Etablierung einer Mauslinie verwendet werden, die die gezielte Veränderung stabil in das Genom integriert hat und weitervererbt. In den Tieren kommt es zu einem Proteinabbruch an Aminosäure 699, der somit 24 Aminosäuren C-terminal der in PHS-Patienten beschriebenen Mutation und 64 Aminosäuren N-terminal der in PAP-A-Patienten gefundenen Mutation lokalisiert ist. Die phänotypische Untersuchung dieser Mutanten ergab, daß die Mutation 3' der Zink-Finger Region einen neuen bisher nicht in *Gli3*-Mutanten beobachteten Phänotyp hervorruft. Zunächst kommt es weder in den heterozygoten noch in den homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Mäusen zur Ausprägung einer präaxialen Polydaktylie, wie sie in den anderen bisher bekannten *Gli3*-Mausmutanten auftritt. Diese Tiere zeigen im heterozygoten Zustand mit geringer Frequenz (3%) die Bildung einer postaxialen Polydaktylie. In homozygoten Tieren bzw. Embryonen zeigt sich mit voller Penetranz ein deutlich stärkerer Phänotyp. Die homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tiere sind neonatal letal und weisen neben einer zentralen Polydaktylie eine Syndaktylie und eine deutliche proximo-distale Verkürzung der Gliedmaßen sowie eine Dysplasie der Nägel auf. Die weiterführenden Untersuchungen der homozygoten Tiere bzw. Embryonen konnten zeigen, daß es in diesen Mäusen nicht nur zu Fehlbildungen des Extremitätenskeletts kommt, sondern weitere schwere Entwicklungsstörungen auftreten. So ist in diesen Tieren die Entwicklung der Wirbelsäule, der Schädelbasis, des Kehlkopfes, des Anus und des Gastrointestinaltrakts sowie der Nieren und Nebennieren betroffen (siehe Tab. 9). Die Vergleiche der in den homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren beobachteten phänotypischen

Veränderungen mit humanen Patienten ergab, daß es sich hier um eine Phänokopie des Pallister-Hall Syndroms handelt.

Die in dieser neuen Mausmutante gefundenen, durch die gezielte Mutation in *Gli3* hervorgerufenen, Veränderungen zeigen weitreichende neue Funktionen von Gli3 während der Entwicklung verschiedener Organe bzw. Organsysteme auf.

4.1 Die Etablierung der ES-Zelllinien

Die beiden Leseraster-Mutationen (Position 2194delG – PHS und 2463delA – PAP-A) sollten in das Maus *Gli3*-Gen eingebracht werden, um im Falle einer Phänokopie die zugrundeliegenden molekularen Veränderungen der beobachteten Phänotypen zu analysieren. Zusätzlich hierzu sollte die Insertion einer Selektionsmarker-Kassette an Position 2402 durch homologe Rekombination in ES-Zellen durchgeführt werden. Als Selektionsmarker-Kassette wurde eine Kombination aus *neo*- und *tk*-Gen verwendet, die neben der beabsichtigten gezielten Manipulation des *Gli3*-Gens die Verwendung der etablierten *Gli3*^{neo/tk}-Klone in der „Double-Replacment“-Strategie (WU, H. ET AL. 1994) erlaubt. Es konnten insgesamt 34 Klone isoliert werden von denen 22 G418-resistent und Ganciclovir-sensitiv waren. Die Übertragung der im Menschen identifizierten Mutationen (PHS – 2023delG; PAP-A – 2358delA) auf die Maus konnte problemlos erfolgen, da in diesem Bereich des *Gli3*-Gens (Position (bp) 2100-2600 des Maus *Gli3*-Gens) auf DNA-Ebene eine hohe Homologie (94%) zwischen den beiden Spezies vorliegt. Die beiden Leserastermutationen wurden ebenfalls durch homologe Rekombination in das *Gli3*-Gen eingefügt und die entsprechenden ES-Zelllinien etabliert. Diese Zelllinien konnten aber nicht wie zuvor beabsichtigt durch die „Double Replacement“-Strategie etabliert werden. Als größte Schwierigkeit hierbei stellte sich heraus, daß keine zuverlässigen Selektionsbedingungen etabliert werden konnten, die die effiziente Anreicherung homolog rekombinanter Klone erlaubt hätten. Trotz eines zuvor durchgeführten Titrationsversuches, der sicherstellen sollte, daß die beiden verwendeten Klone *Gli3*^{neo/tk} #36 und #216 Ganciclovir-sensitiv sind und ein Absterben bei der während der Selektion der transfizierten ES-Zellen eingesetzten Konzentration von 0,2µM gewährleistet ist (Daten nicht gezeigt), konnte keine effiziente Anreicherung beobachtet werden. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse von WU, H. ET AL. 1994 unterstützt. Hier konnten zwar homolog rekombinante Klone isoliert werden, aber es wurde ebenfalls ein häufiges Auftreten von GANC^r Zellklonen nach der Selektion beobachtet. Diese Klone hatten nicht homolog rekombiniert und die *neo/tk*-Selektionsmarker-Kassette war noch in dem *Col1-a1*-Gen integriert. Als weiterer erschwerender Faktor kam hinzu, daß die transfizierten

Gli3^{neo/tk}-ES-Zellen während der Selektionsprozedur ihre Morphologie sehr stark veränderten und als Konsequenz hiervon, die Verwendbarkeit möglicher homolog rekombinanter Klone für die Generierung von chimären Mäusen fraglich erschien. Ein Grund hierfür lag in der Überschreitung der optimalen Kulturdichte durch die fehlende Reduktion der Zell- bzw. Koloniezahl durch die Entfernung der nicht homolog rekombinanten Klone während der Selektion. Eine Reduktion der Zellzahl, die nach der Transfektion der ES-Zellen auf die einzelnen Zellkulturschalen ausgebracht wurde, konnte keine Verbesserung der Selektion oder Morphologie der Zellen bewirken (Daten nicht gezeigt). Neben der überschrittenen optimalen Kulturdichte kann zusätzlich die Kombination der verwendeten Selektionsdroge und der eingesetzten ES-Zellen als mögliche Ursache für die beobachteten Veränderungen in Betracht gezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden, im Gegensatz zu der initialen Publikation der Methode, ES14-1 und nicht J1 ES-Zellen verwendet. Hier könnte eine mögliche Erklärung für das beobachtete Verhalten der verwendeten ES-Zellen liegen. Einzelne ES-Zelllinien, die aus unterschiedlichen Mausstämmen (meist 129P- oder 129S-Stämme; Übersicht bei SIMPSON, E.M. ET AL. 1997; THREADGILL, D.W. ET AL. 1997; FESTING, M.F.W. ET AL. 1999) isoliert worden sind, weisen unterschiedliches Wachstumsverhalten und unterschiedliche Ansprüche an die Kulturbedingungen auf. Dieses wird z.B. deutlich an der absoluten Abhängigkeit einzelner Linien auf MEF-Nährzellen (z.B. ES14-1) kultiviert zu werden, wohingegen andere Linien unabhängig hiervon auf Gelatine-beschichteten Kulturschalen in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden können (z.B. D3 und R1). Weiterhin wird dieses deutlich an der Notwendigkeit, die einzelnen optimalen Kulturbedingungen (Medium-Zusammensetzung, Serum-Charge) und die effizientesten Bedingungen für die Selektion transfizierter Zellen mit der erforderlichen Droge für die einzelnen ES-Zelllinien auszutesten (Übersicht bei ROBERTSON, E. 1989; TORRES, R.M. UND KÜHN, R. 1997; JOYNER, A.L. 1999). Zusammenfassend kann also ein negativer Einfluß der verwendeten Droge (Ganciclovir) bzw. der angewendeten Selektionsbedingungen auf die in dieser Arbeit verwendeten ES-Zellen (ES 14-1) nicht ausgeschlossen werden.

Zusätzlich zu den in diesem Zusammenhang beobachteten experimentellen Schwierigkeiten scheint die hier eingesetzte Methode im Vergleich zu anderen problematischer zu sein, da nur die bereits erwähnte Publikation gefunden werden kann, in der eine gezielte Mutation mit dieser Technik in ein Gen eingeführt worden ist. Der Großteil der sog. "Double replacement"-Ansätze wird entweder durch die „tag-and-exchange“-Methode (ASKEW, G.R. ET AL. 1993) und „hit-and-run“-Strategie durchgeführt, oder aber unter Verwendung von *Hprt*-defizienten ES-Zelllinien, in denen zwei sequentielle

Mutagenese-Schritte durchgeführt werden (STACEY, A. ET AL. 1994; HORMUZDI, S.G. ET AL. 1998). Zusätzlich hierzu findet das Cre/loxP-System immer stärkere Anwendung für derartige Mutagenese-Ansätze (Übersicht bei MÜLLER, U. 1999; NAGY, A. 2000).

Die Etablierung der Zelllinien mit den Leserastermutationen konnte jedoch durch die in Abb. 3.9 bzw. 3.12 dargestellte Vorgehensweise erreicht werden. Dies führte zur Etablierung von drei ES-Zellklonen (#3; #80; #320), die die Leserastermutation 2194delG (PHS) und von zwei Klonen (#54; #170), die die Leserastermutation 2463delA (PAP-A) jeweils zusammen mit der Erkennungssequenz der diagnostischen Restriktionsendonuklease *Bam*HI tragen. Zusätzlich hierzu enthalten die ES-Zellklone eine von loxP-Erkennungssequenzen flankierte Selektionsmarker-Kassette (*neo*), die durch die transiente Expression der Cre-Rekombinase entfernt werden kann.

4.2 Generierung von chimären Mäusen mit den etablierten ES-Zellklonen

Mit den etablierten ES-Zellklonen *Gli3*^{mPHS-neoflox} und *Gli3*^{mPAP-A-neoflox} konnten im Verlauf dieser Arbeit keine chimären Mäuse erzeugt werden. Es erfolgte sowohl der Einsatz von Blastozysten-Injektionen als auch von Aggregationen der ES-Zellen mit Embryonen des Morula-Stadiums. In keinem der gewählten Ansätze konnten transferierbare Blastozysten erhalten werden. Die Ursache hierfür liegt in einer Vielzahl von Schwierigkeiten, die bei der Etablierung und Durchführung einer relativ komplexen Technik auftreten können (Donor-Tiere, Medium, Kulturbedingungen, Handhabung der Zellen und Embryonen, Handhabung der Geräte, tierexperimentelle Vorgehensweisen), so daß eine Festlegung auf eine einzelne Ursache oder mehrere sehr schwer erfolgen kann. Es könnte jedoch auch davon ausgegangen werden, daß die verwendeten ES-Zellklone sich nach der durchgeführten stabilen Transfektion nicht mehr in einem Zustand befinden, der es ihnen erlaubt an der Entwicklung aller Gewebe und Organe einer chimären Maus teilzunehmen (Pluripotenz). Dieses ist jedoch nicht wahrscheinlich, da in den jeweiligen Experimenten auch keine Nachkommen aus Kontroll-Injektionen bzw. Aggregationen erhalten wurden, bei denen die Embryonen nicht mit den verwendeten ES-Zellen in Kontakt gekommen sind. Außerdem konnten aus den *Gli3*^{neo/tk}-Zellen, die auf entsprechende Art und Weise der Mutagenese unterzogen worden sind wie die anderen Zellen und die in ihrer Morphologie und dem Wachstumsverhalten den hier eingesetzten entsprachen, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Rajewsky, Institut für Genetik, Universität Köln chimäre Mäuse erzeugt werden. Diese chimären Mäuse konnten mit den ES-Zellklonen *Gli3*^{neo/tk} #36 und #216 generiert werden. Hierbei wurden insgesamt 10 Chimären (4 männliche/6 weibliche) erhalten. Diese wurden auf mögliche phänotypische Veränderungen hin untersucht, da

bereits in einer Vielzahl von Fällen die Analyse von in chimären Mäusen oder Embryonen aufgetretenen phänotypischen Veränderungen zur funktionellen Charakterisierung von Genen verwendet werden konnten (Übersicht bei WEST, J.D. 1999). Aufgrund ihrer Fellfarbe hatten vier dieser Tiere einen Grad der Chimärität von über 70% und zeigten zusätzlich hierzu eine Veränderung der Vordergliedmaßen. Bei dieser Veränderung handelte es sich um die Ausbildung einer postaxialen Polydaktylie. Es kann davon ausgegangen werden, daß diese Polydaktylie durch die in die ES-Zellen eingebrachten Mutation verursacht wird. Durch den hohen Grad der Chimärität kommt es während der Embryonalentwicklung zu einem erhöhten Anteil der ES-Zellen in der Gliedmaßenknospe und somit zur Ausbildung der postaxialen Polydaktylie. Hier deutete sich somit eine erste Konsequenz der gezielt eingeführten *Gli3*-Mutation (C-terminale Verkürzung des Proteins) für die Gliedmaßenentwicklung in den chimären Tieren an. Der beobachtete Phänotyp zeigte ebenfalls, daß in der Maus durch Mutationen die 3' der Zink-Finger Region lokalisiert sind, eine postaxiale Polydaktylie hervorgerufen werden kann. Die erhaltenen Chimären wurden im Nachfolgenden für Testkreuzungen auf Keimbahntransmission eingesetzt. Hierbei konnte gefunden werden, daß vier der sechs männlichen Chimären keinerlei Keimbahntransmission des durch die ES-Zellen eingebrachten genetischen Materials zeigten. Eine Chimäre zeigte eine Transferrate von 9% und die andere von 88%. Unter den erhaltenen Nachkommen, die (aufgrund der Fellfarbe) aus Gameten mit ES-Zell-Ursprung hervorgegangen waren, konnte jedoch keine gefunden werden, die das mutierte *Gli3*-Allel trugen.

Das Ausbleiben der Keimbahntransmission des mutierten Allels durch die Männchen hat seinen Ursprung in dem gewählten experimentellen Ansatz. Durch das Einbringen der *neo/tk*-Kassette und der damit verbundenen Expression des *tk*-Gens unter der Kontrolle des PGK-Promoters kommt es in den männlichen Chimären zu einer Reduktion der Fruchtbarkeit (ELLISON, A.R. ET AL. 2000). In diesen Tieren kommt es sehr wahrscheinlich zu einem spezifischen Verlust der Spermien, die das mutierte *Gli3*-Allel tragen oder zur Bildung von, im Vergleich zu den Wildtyp-Spermien, in ihrer normalen Funktion stark beeinträchtigten und nicht konkurrenzfähigen Spermien (ELLISON, A.R. ET AL. 2000). Gleichzeitig wurde versucht, durch die weiblichen Chimären eine Keimbahn-Transmission des mutierten Allels zu erhalten, da keine negative Beeinflussung der Oogenese beschrieben worden ist (ELLISON, A.R. ET AL. 2000). Drei der vier weiblichen Chimären zeigten eine Transmission der ES-Genoms durch die Keimbahn (3%; 40%; 13%). Die Keimbahntransmission des ES-Zellmaterials durch weibliche Chimären ist jedoch insgesamt schwierig und in der Regel ineffizient, da hier häufig Schwierigkeiten während

der Differenzierung der Geschlechtsorgane und der Gametogenese auftreten, da die verwendeten ES-Zellen einen XY-Karyotyp aufweisen (Übersicht bei PAPAIOANNOU, V. UND JOHNSON, R.L. 1999). Dennoch konnten unter den insgesamt 13 Nachkommen mit ES-Zell-Ursprung der weiblichen Chimären drei (1 Männchen/2 Weibchen) identifiziert werden, die die gezielte Mutation trugen.

4.3 Die *Gli3*^{Δ699}-Mauslinie

Die aus den Testkreuzungen erhaltenen Tiere, die das gezielt manipulierte *Gli3*-Allel trugen, wurden im Nachfolgenden eingesetzt, um die *Gli3*^{Δ699}-Linie zu etablieren.

4.3.1 Die Auswirkungen der gezielten Mutagenese auf das *Gli3*-Transkript

Die Analyse des nach der Insertion der *neo/tk*-Kassette in das Exon n-1 des *Gli3*-Gens gebildeten Transkripts ergab, daß eine artifizielle mRNA gebildet wird. Durch verändertes Splicing kommt es zum Verlust von 131 bp *Gli3*-kodierender Sequenz und der gleichzeitigen Insertion von 59 bp Sequenz aus der Selektionsmarker-Kassette. Dieser Austausch der Sequenzen und der damit verbundene Verlust von 72 bp verursacht zusätzlich eine Leseraster-Mutation, die eine vorzeitige Termination des kodierten *Gli3*-Proteins mit einer Fusion von 22 nicht für *Gli3*-kodierenden Aminosäuren zur Folge hat. Die Ursache für das beobachtete veränderte Splicing im mutierten *Gli3*-Allel scheint eine kryptische Splice-Akzeptoren-Stelle im 3'-Bereich des *tk*-Gens zu sein. Die Verwendung dieser Splice-Stelle während der Bildung der reifen mRNA führt zur Bildung des beschriebenen Transkripts in *Gli3*^{Δ699}-Tieren. Die Veränderung des erwarteten Transkripts durch die in das Gen eingefügte Selektionsmarker-Kassette konnte auch im Zusammenhang mit anderen Mutagenese-Ansätzen beobachtet werden. So kann es z.B. durch die Verwendung einer kryptischen Splice-Akzeptoren-Stelle in der Selektionsmarker-Kassette (*neo*), die in einem Intron plaziert und in der selben Transkriptionsrichtung wie das manipulierte Gen orientiert ist, zur Ausprägung eines sog. hypomorphen Allels kommen (MEYERS, E.N. ET AL. 1998 und Übersicht bei NAGY, A. 2000). Durch die Insertion der Selektionsmarker-Kassette in ein Exon kann es zusätzlich zu der Möglichkeit der Verwendung einer kryptischen Splice-Akzeptoren-Stelle aber auch zu einer Entfernung des gesamten Exons zusammen mit der inserierten Selektionsmarker-Kassette kommen, so daß ebenfalls ein neues Transkript entsteht (PARK, H. ET AL. 2000). Aufgrund der beobachteten Abweichungen vom erwarteten Splicing und dem gebildeten Transkript in den *Gli3*^{Δ699}-Tieren wurde zusätzlich versucht, das gebildete Protein

nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurden zum Einen der von WANG, B. ET AL. 2000 publizierte Gli3-Antikörper benutzt, der jedoch keinerlei Proteinnachweis in einem „Western-blot“ unter Verwendung von Proteinextrakten verschiedener Embryonalstadien der einzelnen Genotypen ($Gli3^{+/+}$; $Gli3^{\Delta 699/+}$; $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$; $Gli3^{Xtj/Xtj}$) erlaubte. Zum Anderen wurde ein Antikörper gegen den N- bzw. C-Terminus von GLI3 verwendet, der von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K.-H. Grzeschik; Institut für Humangenetik; Philipps Universität; Marburg zur Verfügung gestellt worden ist. Hiermit konnten jedoch keine spezifischen Signale in den verwendeten Proteinextrakten erhalten werden, so daß keine Aussagen über das in den $Gli3^{\Delta 699}$ -Tieren gebildete Gli3-Protein gemacht werden können.

4.3.2 Die heterozygoten $Gli3^{\Delta 699}$ -Tiere

Die in den chimären Tieren gefundene postaxiale Polydaktylie der Vordergliedmaßen konnte in den heterozygoten $Gli3^{\Delta 699}$ -Tieren zunächst nicht beobachtet werden. Durch Rückkreuzung der Tiere mit Mäusen des Stammes 129P2, dem Ausgangsstamm der ES-Zellen, konnte das Auftreten der postaxialen Polydaktylie in 6% der Tiere beobachtet werden. Im Verlauf der weiteren Kreuzungen mit Mäusen des Stammes C57Bl/6 sank die Frequenz jedoch auf 3% ab. Ferner zeigte die insgesamt schwach ausgebildete finger-artige Struktur an der postaxialen Seite keinerlei verknorpelte oder verknöcherte Strukturen. Aufgrund der geringen Penetranz und der Abhängigkeit des Phänotyps vom verwendeten Mausstamm muß von einem modifizierenden Einfluß des genetischen Hintergrundes auf den beobachteten Gliedmaßen-Phänotyp ausgegangen werden. Ein ähnlicher Befund konnte für die postaxiale Polydaktylie der Vordergliedmaßen in *CRABP-II* mutanten Mäusen gemacht werden (FAWCETT, D. ET AL. 1995). Auch hier zeigte sich eine unterschiedliche Penetranz des Phänotyps in Abhängigkeit vom verwendeten Mausstamm (129Sv 50%; C57Bl/6 30%; CD1 10%). Der Einfluß des genetischen Hintergrundes auf den Phänotyp kann in einer Vielzahl von Mausmutanten beobachtet werden. Er spielt eine wichtige Rolle in der Suszeptibilität der Mäuse gegenüber verschiedenen Fehlbildungen. Der Einfluß des genetischen Hintergrundes erlangt somit in der Untersuchung der phänotypischen wie molekularen Veränderungen, die durch Mutationen in einem Gen hervorgerufen werden, immer größere Bedeutung. Die Verwendung verschiedener Mausstämme ermöglicht es nicht nur, die Auswirkung einer Mutation in einem definierten genetischen Hintergrund (Inzuchtstämme) zu untersuchen, sondern auch die Auswirkungen in verschiedenen Stämmen und Kombinationen verschiedener Stämme zu analysieren. Hierdurch kann die Heterogenität eines Phänotyps, der durch dieselbe Mutation hervorgerufen wird, in seiner Gesamtheit dargestellt werden und der Einfluß bzw. die

Existenz von modifizierenden Genen untersucht werden. Durch den Einfluß modifizierender Gene können vollständig unauffällige Tiere auftreten oder es kann zu einer Verstärkung des Phänotyps kommen (Übersicht bei ERICKSON, R.P. 1996; ESTIVILL, X. 1996; DOETSCHMAN, T. 1999; MONTAGUTELLI, X. 2000; LINDER, C.C. 2001; NADEAU, J.H. 2001; SANFORD, L.P. ET AL. 2001 sowie ASHER JR, J.H. ET AL. 1996; MASUYA, H. ET AL. 1997; NGUYEN, P.V. ET AL. 2000). Der Einfluß kann sogar soweit gehen, daß die Letalität der einzelnen Mutanten durch den genetischen Hintergrund beeinflusst wird. Dies wurde bereits eindrucksvoll z.B. anhand des *Tgfb1*-Mutanten gezeigt, die eine 50 bzw. 99%ige Letalität im Präimplantationsstadium in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund zeigen. Außerdem kommt es noch zu einer deutlichen Veränderung der beobachteten Phänotypen in den einzelnen verwendeten Mausstämmen (SIBILIA, M. UND WAGNER, E.F. 1995; THREADGILL, D.W. ET AL. 1995). Die Hypothese, daß der beobachtete Gliedmaßen-Phänotyp in heterozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren durch den genetischen Hintergrund beeinflusst wird und *Gli3* somit das Ziel der modifizierenden Aktivität eines oder mehrerer bisher unbekannter Gene ist, wird unterstützt durch die in hetero- und homozygoten *Xt*^l-Embryonen gemachten Beobachtungen. So konnte in heterozygoten *Xt*^l-Embryonen, die aus Kreuzungen von *Xt*^l-Tieren (C57Bl/6 x C3H-Hintergrund) mit *Gli3*^{Δ699}-Tieren (C57Bl/6 x 129P2-Hintergrund) hervorgegangen waren, das Auftreten einer postaxialen Polydaktylie beobachtet werden, die in ihrer Ausprägung der in *Gli3*^{Δ699}-Tieren beobachteten entsprach (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte eine postaxiale Polydaktylie in homozygoten *Xt*^l-Embryonen beobachtet werden, wenn hier der Anteil des C3H-Stammes am genetischen Hintergrund zunahm. Zusätzlich hierzu kann das Auftreten eines sog. Postminimus auf der postaxialen Seite der Extremitäten in einzelnen Patienten mit GCPS als weiterer Hinweis für den Einfluß des genetischen Hintergrundes auf den durch Mutationen in *Gli3* hervorgerufenen Gliedmaßen-Phänotyp gewertet werden. Derartige Modifikationen des Gliedmaßen-Phänotyps sind nicht nur für *Gli3* beschrieben sondern auch für Mausmutanten, die Mutationen in den anderen beiden *Gli*-Genen tragen. So kann mit sehr geringer Frequenz das Auftreten einer postaxialen Polydaktylie ebenfalls in *Gli1/Gli2*-Doppelmutanten beobachtet werden (PARK, H. ET AL 2000).

Hieraus ergibt sich, daß das Auftreten einer postaxialen Polydaktylie sehr stark vom genetischen Hintergrund abhängig ist. Gleichzeitig stellt sich die Frage inwieweit die Mutationen in den einzelnen Mutanten verantwortlich sind für die Ausbildung der postaxialen Polydaktylie.

4.3.3 Die homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tiere

Im Gegensatz zu den heterozygoten Tieren sind die homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tiere neonatal letal. Außer an einer veränderten Gliedmaßen-Morphologie sind die Neugeborenen zunächst nicht von Wildtyp- oder heterozygoten Geschwistertieren zu unterscheiden. Im Verlauf der ersten 12 Stunden nach der Geburt sterben die homozygoten Tiere. In dieser Zeit fällt jedoch auf, daß sie im Vergleich zu ihren Geschwistern keinen sog. Milchbauch zeigen. Das heißt, daß die Tiere im Verlauf dieser Stunden keine oder nur sehr wenig Nahrung aufnehmen. Eine entsprechende Beobachtung konnte in *Hmg1*^{-/-}-Tieren (CALOGERO, S. ET AL. 1999) und vorallem in *C/EBPα*^{-/-}-Tieren (WANG, N-D, ET AL. 1995) gemacht werden. In letzteren kommt es ebenfalls nicht zu einer effizienten Nahrungsaufnahme in den ersten Stunden nach der Geburt und aufgrund des bestehenden Energiebedarfs des Neugeborenen zu einem Aufbrauchen der geringen prenatal angelegten Glykogen-Reserven der Leber. Verbunden damit kommt es zu einer zunehmenden Schwächung der homozygoten Tiere, die hierdurch nicht in der Lage sind, unter den bestehenden Konkurrenzbedingungen innerhalb eines Wurfes weitere Nahrung aufzunehmen. Es kommt zur Entwicklung einer Hypoglykämie, die schließlich zum Tod führt. Die in *C/EBPα*^{-/-}-Tieren gemachten Beobachtungen könnten auch ursächlich für die Letalität der homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tiere sein. Unterstützt wird dieses noch durch die im Zusammenhang mit der neonatalen Letalität diagnostizierten Hypoglykämie in einigen PHS-Patienten (HALL, J.G. ET AL. 1980).

Die weitere Untersuchung zeigte eine massive Ansammlung von Luft im Magen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Art Schluckatmung sein, die auch in neonatal letalen *Sox9*^{-/-}-Tieren gefunden wurde (BI, W. ET AL. 2001). In diesen Tieren konnte als Ursache hierfür eine stark ausgeprägte Kiefer-Gaumen-Spalte verantwortlich gemacht werden. In homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren könnten der fehlende Kehldeckel und die Fehlbildungen des Kehlkopfes, die zur Ausbildung einer Spalte zwischen Larynx und Ösophagus führen, für die starke Ansammlung von Luft im Magen verantwortlich sein. Es kann in diesem Zusammenhang davon ausgegangen werden, daß sich diese Entwicklungsstörung des Kehlkopfes ebenfalls negativ auf die Nahrungsaufnahme auswirkt und zu einer Verstärkung einer eventuell auftretenden Hypoglykämie beiträgt.

Die weitere Untersuchung des Gastrointestinaltrakts zeigte in den homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren die Ausbildung eines imperforierten Anus sowie die Verkürzung des Darms und eine Verringerung der Windungen. Zusätzlich konnte die Reduktion bzw. der Verlust der die Oberfläche vergrößernden Villi im Darm und im Kolon gefunden werden und eine nur sehr dünn ausgebildete Wandung des Kolons und Rektums. Weiterhin kommt es zu einem

Verschluß sowie einer massiven Erweiterung des Kolons, das blind in der Bauchhöhle endet. Die in den *Gli3*^{Δ699}-Tieren beobachtete Erweiterung des Kolons in Verbindung mit der deutlichen Verringerung der Wandungsstärke erinnert sehr stark an das klinische Erscheinungsbild der Hirschsprung's Krankheit (GRAY, S.W. UND SKANDALAKIS, J.E. 1972; RIDDELSBERGER JR, M.M. 1989). Zusätzlich hierzu entsprechen die in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren gefundenen Veränderungen den in *Shh*^{-/-}-Tieren und in besonderem Maße den in *Ihh*^{-/-}-Tieren gefundenen Veränderungen des Gastrointestinaltrakts (RAMALHO-SANTOS, M. ET AL. 2001). Die *Shh*^{-/-}-Tiere zeigen ebenfalls einen imperforierten Anus und ein verschlossenes blind in der Körperhöhle endendes Kolon. In *Ihh*^{-/-}-Tieren können die anderen in *Gli3*^{Δ699}-Tieren gefundenen Veränderungen beobachtet werden. Auch hier kommt es zu einer Veränderung des Magenepithels, einer Reduktion der Villi im Darm und im Kolon und einer massiven Erweiterung des Kolons verbunden mit einer starken Reduktion der Wandungsstärke. Die Entwicklung des Gastrointestinaltrakts ist in hohem Maß von epithelial-mesenchymalen Interaktionen abhängig. Während der Entwicklung bildet sich zunächst aus dem endodermalen Epithel eine Röhre, die von mesodermalen Zellen umgeben wird. Im weiteren Verlauf der Entwicklung kommt es zur Differenzierung dieser einfachen Struktur zum Gastrointestinaltrakt. Hieran sind eine Reihe von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen beteiligt. Zu diesen gehören, vorallem für die Entwicklung und Differenzierung des hinteren Darmabschnittes (Dünndarm, Blinddarm, Enddarm, Analkanal), *Shh*, *Bmp4* und die *Hox* Gene der 5' paralogen Gruppen 9-13 (Übersicht bei YASUGI, S. 1993; MONTGOMERY, R.K. ET AL 1999; WELLS, J.M. UND MELTON, D.A. 1999; GRAPIN-BOTTON, A. UND MELTON, D.A. 2000; ROBERTS, D.J. 2000). Neben einer Vielzahl von möglichen Interaktionspunkten der *Gli3*^{Δ699}-Mutation mit den oben aufgeführten Signalwegen ist, aufgrund der beobachteten Entsprechung der Phänotypen von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-, *Shh*^{-/-}- und *Ihh*^{-/-}-Tieren, eine negativen Beeinflussung der Übermittlung des *Ihh*-Signals (und auch in geringem Umfang des *Shh*-Signals) als Auslöser für die beobachteten Entwicklungsstörungen sehr wahrscheinlich.

Die weitere Untersuchung der inneren Organe zeigte, daß es in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Tieren auch zu einer Störung der Entwicklung und Differenzierung der Niere kommt. In den homozygoten Tieren ist im Gegensatz zum Wildtyp nur eine Niere ausgebildet und diese ist zusätzlich in ihrer Differenzierung gestört und zeigt eine veränderte Morphologie.

Die Entwicklung des Urogenitalsystems und damit der Niere ist von einer Vielzahl von Gewebeinteraktionen während der Organogenese abhängig. Es entwickelt sich aus dem intermediären Mesoderm, das eine Reihe von epithelialen Transformationen durchläuft, um die Kanäle und Tubuli zu bilden, die schließlich die urogenitalen Gänge und die Nieren

formen (Übersicht bei SAXÉN, L. 1987). Die Differenzierung verläuft in einem dreistufigen zeitlich und räumlich koordinierten Prozeß von rostral nach caudal, der über Pronephros, Mesonephros und Metanephros schließlich zur Ausbildung der Niere und der ableitenden Harnwege führt (Übersicht bei GROBSTEIN, C. 1953;1955). Dieser koordinierte, eine Vielzahl von Gewebeinteraktionen erfordernde, Prozeß ist in einer Reihe von Mausmutanten gestört, so daß es zum Verlust der Nieren oder der ableitenden Harnwege kommt, oder diese Strukturen schwere morphologische Veränderungen aufweisen, die ihre normale Funktionsfähigkeit stark einschränken oder verhindern. In diesen Mausmutanten, zu denen z.B. *Emx2*-, *Pax2*-, *Wnt4*-, *Wt1*-, *c-Ret*- und *GDNF*-defiziente Tiere zählen, können eine Vielzahl von Störungen der Nierenentwicklung beobachtet werden, die mit dem Verlust der Anlage, der Initiation der Entwicklung oder mit der terminalen Differenzierung der einzelnen Strukturen (Agenesie/Dysplasie) korreliert werden können (KREIDBERG, J.A. ET AL. 1993; SCHUCHARDT, A. ET AL. 1994; TORRES, M. ET AL. 1995; SCHUCHARDT, A. ET AL. 1996; MOORE, M.M. ET AL. 1996; SÁNCHEZ, M.P. ET AL. 1996; PICHEL, J.G. ET AL. 1996; MIYAMOTO, N. ET AL. 1997). In keiner der beobachteten Mutanten kommt es aber zu der Kombination von Verlust nur einer Niere nach der paarigen Anlage des metanephrischen Blastems und Störungen der Differenzierung der verbleibenden Niere. Eine detaillierte histologische und molekulare Untersuchung der Nierenentwicklung in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Tieren kann somit weitere Einblicke in die zugrunde liegenden Prozesse geben, da der hier beobachtete Phänotyp im Vergleich zu den anderen Mutanten etwas schwächer zu sein scheint. Als mögliche Ansatzpunkte für eine molekulare Analyse bieten sich hier die Gene der *Wnt*-Familie, die von zentraler Bedeutung für die Differenzierung der Niere sind (Übersicht bei VAINIO, S.J. UND UUSITALO, M.S. 2000), da hier in neuerer Zeit eine zunehmende Anzahl von Experimenten auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen *Gli3* und *Wnt*-Proteinen hinweisen. Von besonderem Interesse könnte aber auch die Untersuchung von *Emx2* und der detaillierte Vergleich der in den beiden Mausmutanten beobachteten phänotypischen Veränderungen sein, da eine Abhängigkeit der *Emx*-Expression von *Gli3* während der Entwicklung des dorsalen Telenzephalons gezeigt werden konnte (THEIL, T. ET AL. 1999A). Neben den beobachteten Störungen der Nierenentwicklung kann auch eine Beeinträchtigung der Entwicklung der Nebennieren in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen beobachtet werden. Es kommt zu einem Verlust einer Nebenniere und einer deutlichen Verkleinerung der verbleibenden. Der Verlust und die Veränderung der Morphologie der Nebenniere kann durch den Verlust oder die gestörte Differenzierung von Vorläuferzellen hervorgerufen werden. Zur näheren Untersuchung wäre ein detaillierter Vergleich von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen mit *Wt1*-

Mutanten erforderlich, sowie die Analyse der *Wt1*-Expression in der sich entwickelnden Nebenniere (MOORE, A.W. ET AL. 1999) sowie der Expressionsanalyse von *SF-1* (*steroidogenic factor 1*), das die gemeinsamen Vorläuferzellen von Nebenniere und Gonaden markiert (HATANO, O. ET AL. 1996).

Aufgrund eines beim Menschen häufig gefundenen Zusammenhangs zwischen Entwicklungs- und Differenzierungsstörungen der Nebennieren und Fehlbildungen der Hypophyse (OPITZ, J.M. UND HOWE, J.J. 1967; RIMOIN, D. UND SCHIMKE, R. 1971; LANES, R. ET AL. 1978; SIPPONEN, P. ET AL. 1978) wurde in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen die Hypophyse auf morphologische Veränderungen untersucht. Hierbei konnten jedoch keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen festgestellt werden, die auf eine Störung der normalen Entwicklung der Hypophyse hingedeutet hätten. Die Entwicklung der anterioren (Adeno-) Hypophyse beginnt mit einer Einstülpung des Oberflächenendoderms des Pharynx und bildet die sog. „Rathke’s pouch“. Die posteriore (Neuro-) Hypophyse ist eine Erweiterung des Neuroektoderms des Dienzephalons. Durch eine fortschreitende Differenzierung und Ausbildung der verknorpelten Strukturen (endochondrale Verknöcherung) des Chondrocraniums, das sich von Neuralleisten-Zellen ableitet, kommt es zu einem Verlust der Verbindung zwischen Pharynx und „Rathke’s pouch“ und zu einer Einbettung der Hypophyse in der knorpeligen Sella turcica, die sich vom Basisphenoid-Knorpel ableitet (NEMZEK, W.R. ET AL. 2000). In homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren konnte im Zusammenhang mit der morphologischen Untersuchung der Hypophyse eine Störung der Verknöcherung des Basisphenoid gefunden werden. In Neugeborenen ist ein deutliches Loch zu erkennen und es kommt somit nicht zum vollständigen Verschluß der foetal vorhandenen Verbindung der Hypophyse zum Pharynx. Ob es im Zusammenhang mit den hier gefundenen Veränderungen der Verknöcherung des Chondrocraniums zu Störungen der Hypophysenentwicklung oder -funktion kommt, kann nicht ausgeschlossen werden, so daß die molekulare Analyse der für die Proliferation und Differenzierung der Hypophyse wichtigen Mitglieder der Shh-, Bmp- und Fgf-Signalwege in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen erfolgen müßte (TREIER, M. ET AL. 2001). Zusätzlich hierzu könnte eine endokrinologische Untersuchung an Neugeborenen durchgeführt werden, um mögliche Funktionsstörungen der Hypophyse zu identifizieren. Derartige Störungen konnten auch in Neugeborenen PHS-Patienten gefunden werden (HALL, J.G. ET AL. 1980) und führen dort zu einem verringerten Wachstum. Die mit der Fehlfunktion der Hypophyse verbundenen Störungen (vorallem das Wachstum) können jedoch durch die anhaltende Gabe von Wachstumshormonen ausgeglichen werden (GALASSO, C. ET AL. 2001). Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Störungen des Chondrocraniums kann in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-

Embryonen eine verzögerte Verschmelzung und -knöcherung des Presphenoid-Knochens gefunden werden. Dies deutet auf einen verzögerten Verschluss des Pharynx hin und kann als Ansatz einer Kiefer-Gaumen-Spalte gewertet werden, die auch in *Gli2*-Mutanten auftritt (MO, R. ET AL. 1997).

Neben den beobachteten Veränderungen der Schädelbasis zeigen auch andere Teile des Skelettes Entwicklungsstörungen. Hierzu gehört unter anderem die Wirbelsäule, die eine vorzeitige Mineralisierung der Wirbelkörper und dorsalen (neuralen) Bögen sowie eine Verschmelzung benachbarter Wirbel zeigt. Die Veränderungen erstrecken sich nicht über die gesamte Wirbelsäule, sondern sind auf die lumbalen Wirbel L2-L6 und sakralen S1-S3 beschränkt. Es konnten keine Veränderungen bzw. Verschmelzungen der zervikalen Wirbel C1-C7 in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren gefunden werden, wie sie z.B. in *Zic1*-Mutanten oder homozygoten *Xt*^l-Tieren gefunden werden können (ARUGA, J. ET AL. 1999). Außerdem zeigten sich keinerlei Abnormalitäten der Ausbildung des Brustkorbes oder des Sternums, die in *Gli2*^{-/-}-Tieren auftreten (MO, R. ET AL. 1997). Die in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren auftretenden Veränderungen gleichen sehr stark den in *Pax1*-Mutanten (WALLIN, J. ET AL. 1994; WILM, B. ET AL. 1998) beobachteten. Die Expressionsanalyse von *Pax1* ergab jedoch keine Veränderung der Expression in den homozygoten Embryonen. Weiterhin kann eine Übereinstimmung des Phänotyps mit *Gli2*^{-/-} (MO, R. ET AL. 1997) und *Bapx1*^{-/-} (LETTICE, L.A. ET AL. 1999) Mäusen gefunden werden, die zusätzlich zu dem Wirbelsäulen-Phänotyp auch Veränderungen der Schädelbasisknochen zeigen. Für alle drei Gene wird, während der Differenzierung der sklerotomalen Zellen, von einer Abhängigkeit ihrer Funktion von Shh, das vom Notochord sekretiert wird, ausgegangen. Hierbei ist *Bapx1* entweder in einem zu *Pax1* parallelen Signalweg oder unterhalb von *Pax1* anzuordnen. Insgesamt scheint somit in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren die Differenzierung der sklerotomalen Zellen gestört zu sein. Diese Störung kann entweder durch eine direkte Unterbrechung der Weiterleitung des Shh-Signals entstehen oder aber auch erst über andere zwischengeschaltete Signalwege verlaufen. Als Konsequenz dieses eventuell veränderten Signals kann es zu einer beschleunigten Differenzierung der hypertrophen Chondrozyten und schließlich zu einer vorzeitigen Mineralisierung der Skelettelemente kommen. Eine derartige beschleunigte terminale Differenzierung der Chondrozyten konnte auch in *Sox9*^{+/-}-Embryonen gefunden werden, die ebenfalls eine vorzeitige Mineralisierung des Wirbelsäulen- und zusätzlich des Schädelskeletts zeigen (BI, W. ET AL. 2001).

Neben dieser Vielzahl von kleineren Veränderungen ist die deutlichste Veränderung des Skeletts das Auftreten einer zentralen Polydaktylie, die verbunden ist mit einer Verbiegung

der Röhrenknochen des Zeugopods (Radius und bes. Tibia) und einer proximo-distalen Verkürzung des gesamten Extremitätenskeletts in homozygoten Tieren. Zusätzlich zeigen die distalen Elemente der Extremitäten im Gegensatz zur Wirbelsäule eine verzögerte Verknöcherung bzw. Mineralisierung und die am weitesten distal gelegenen Strukturen, die Nägel, zeigen eine drastische Differenzierungsstörung. Die beobachtete Verkürzung der Gliedmaßen entlang der proximo-distalen Achsen kann durch unterschiedliche Faktoren in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren hervorgerufen werden. Zum Einen wäre eine Verringerung der AER-Funktion (bei unveränderter *Fgf8*-Expression) während der Gliedmaßenentwicklung denkbar, so daß es zu einer verringerten Proliferation der mesenchymalen Zellen in der Gliedmaßen-Knospe kommt. Zusätzlich könnte eine Reduktion der Zellzahl in der Gliedmaßenknospe durch vermehrte Apoptose während der Entwicklung diesen Phänotyp erklären. Neben diesen frühen Effekten in der Gliedmaßenentwicklung könnten aber auch spätere Störungen zu dem beobachteten Phänotyp führen. Für die Ausbildung und das Längenwachstum der Röhrenknochen sind die Wachstumszonen (Epiphysen) von zentraler Bedeutung. Für ihre normale Entwicklung ist eine koordinierte Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten von enormer Bedeutung. Diese Koordination wird durch einen Rückkopplungsmechanismus zwischen *Ihh* und PTHrP (parathyroid hormone-related protein) erreicht und führt zu einem fein abgestimmten Maß an Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumszone der Knochen (KRONENBERG, H.M. UND CHUNG, U.2001). An dieser Regulation sind eine Vielzahl weitere Faktoren, wie z.B. *Fgfr3*, beteiligt. Eine gezielte Mutation in *Fgfr3* führt zu einem neonatal letalen Zwergwuchs in Mäusen mit einer starken Reduktion der Röhrenknochen, der seine Entsprechung in der thanatophoren Dysplasie Typ II des Menschen hat (IWATA, T. ET AL. 2000). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren beobachtete proximo-distale Verkürzung der Röhrenknochen, ihre Verbiegung und die verzögerte Mineralisierung der distalen Elemente der Extremität auf eine Störung der durch *Ihh* und PTHrP aufrecht erhaltenen Koordination von Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten zurückzuführen ist. Es könnte also als Folge der in das *Gli3*-Gen eingefügten Mutation zu einer Verringerung der Proliferation und einer verzögerten Differenzierung der Chondrozyten und einer verminderten Aktivität der Osteoblasten kommen. Die beobachtete Verbiegung der Röhrenknochen könnte die Folge einer asymmetrischen Proliferation der Chondrozyten sein oder die Folge sekundärer Einflüsse während der Embryonalentwicklung (BI, W. ET AL. 2001). Die in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren gefundene zentrale Polydaktylie stellt eine eher ungewöhnliche Form der

Gliedmaßenveränderung dar. Die in der Maus am häufigsten beobachtete Form der Polydaktylie ist die präaxiale, die mit einer ektopischen Expression von *Shh* in der anterioren Gliedmaßenknospe korreliert werden kann (MASUYA, H. ET AL. 1995; MASUYA, H. ET AL. 1997; BÜSCHER, D. ET AL. 1997). Im Menschen kommt es ebenfalls zu einem verstärkten Auftreten von präaxialen Polydaktylien und einem deutlich verringerten Auftreten von postaxialen Polydaktylien. Aufgrund von ausgedehnten Transplantationsexperimenten im Huhn und in der Maus hat man mittlerweile eine relativ gute Vorstellung über die Mechanismen, die der Entstehung von präaxialen und postaxialen Polydaktylien zugrunde liegen. Von zentraler Bedeutung scheinen hierbei Nicht-Gliedmaßenzellen zu sein, die angelockt werden (z.B. von *Fgf4*) und in die Gliedmaßen ausbildenden Regionen einwandern. Hier sind sie in der Lage, unter dem Einfluß der in den Gliedmaßen vorhandenen Signalmolekülen (bes. *Shh*), selbst Signalzentren und Gliedmaßenstrukturen auszubilden. Dieser Ablauf während der Entwicklung kann zur Ausprägung einer präaxialen oder postaxialen Polydaktylie führen (TANAKA, M. ET AL. 2000). Im Menschen und in der Maus sind dagegen zentrale Polydaktylien bisher nur in Synpolydaktylie (SPD)- und Pallister-Hall Syndrom-Patienten bzw. in homozygoten *spdh*-Mäusen beschrieben worden. Die in homozygoten *spdh*-Mäusen beobachtete zentrale Polydaktylie wird durch eine Insertion von 21 bp in die kodierende Sequenz des *Hoxd13*-Gens verursacht, die zu einer Verlängerung einer Alanin-Ansammlung im Protein von 15 auf 22 führt (HALL, J.G. ET AL. 1980; MANOUVRIER-HANU, S. ET AL. 1999; GOODMAN, F.R. ET AL. 2001; JOHNSON, K.R. ET AL. 2001). Die in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren beobachtete zentrale Polydaktylie wird durch die gezielt eingebrachte Mutation des *Gli3*-Gens und den damit verbundenen vorzeitigen Proteinabbruch C-terminal der Zink-Finger Region verursacht. Die molekularen Veränderungen des genetischen Programmes der Gliedmaßenentwicklung, die zu diesem Phänotyp führen, sind vergleichbar denen der *spdh*-Maus unbekannt und lassen sich mit den zuvor beschriebenen Mechanismen der Entwicklung von Polydaktylien (TANAKA, M. ET AL. 2000) nicht erklären. Die Analyse der Expression verschiedener an der Gliedmaßenentwicklung beteiligter Gene (Übersicht bei COHN, M.J. UND TICKLE, C. 1996; JOHNSON, R.L. UND TABIN, C.J. 1997; SCHWABE, J.W.R. ET AL. 1998; VOGT, T.F. UND DUBOULE, D. 1999 sowie PIZETTE, S. UND NISWANDER, L. 1999; ZUNIGA, A. ET AL. 1999; DROSSOPOULOU, G. ET AL. 2000; CHARITE, J. ET AL. 2000; FERNANDEZ-TERAN, M. ET AL. 2000) in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen konnte keinen Aufschluß über die molekularen Veränderungen geben, die zu der zentralen Polydaktylie führen. So wurde zunächst die Musterbildung entlang der A/P-Achse der Gliedmaßenknospe untersucht, die für die

Ausbildung der korrekten Anzahl und Morphologie der späteren Finger entscheidend ist. Die Analyse der *Shh* Expression, die mit der ZPA-Aktivität kolokalisiert und bei ektopischer Expression zu einer Reorganisation der Musterbildung und zur Polydaktylie führt, ergab keine Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls die Expression von *dHAND* untersucht. *dHAND* scheint für die Etablierung der A/P-Achse von großer Bedeutung zu sein und wirkt oberhalb von *Shh* aktivierend auf die Expression von *Shh*, 5'-*Hoxd*-Genen und *Bmp2*. Auch hier konnte keine Veränderung der Expression gefunden werden. Zusätzlich zu der Analyse der Expression dieser beiden für die Musterbildung entlang der A/P-Achse wichtigen Gene wurde auch die Expression des als Vermittler der Shh-Signalaktivität geltenden *Gli*-Familienmitgliedes *Gli1* untersucht. Hier zeigte sich nur in den Vordergliedmaßen von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen (E 11,5) eine Verringerung der Expression im Vergleich zu Vordergliedmaßen von Wildtyp-Embryonen. Weiterhin wurde die Expression von *Bmp4* untersucht, das dynamisch während der Gliedmaßenentwicklung exprimiert ist und in frühen Stadien in der AER und dem Mesenchym und später besonders im interdigitalen Mesenchym zu finden ist. Neben einer Funktion während der Musterbildung kann von einer weiteren Funktion während der Chondrogenese und dem programmierten Zelltod (Apoptose) ausgegangen werden. Zusätzlich wurde die Expression von *Msx2* untersucht, das ein Zielgen und Signalvermittler von *Bmp4* darstellt. Diese Untersuchungen ergaben jedoch keine offensichtlichen Veränderungen in der Expression der beiden Gene in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen. Neben der frühen Musterbildung in der Gliedmaßenknospe wurde auch die Umsetzung der positionellen Informationen während der Gliedmaßenmorphogenese (Differenzierung) untersucht. Exemplarisch wurde die Expression von *Hoxd-13* untersucht, das als 5'-Mitglied der *HoxD*-Gene sowie als *Hox-13* Paralogs in der distalen Extremität an der Spezifizierung des Autopods beteiligt sind. Es ergaben sich allerdings keine Veränderungen der *Hoxd-13* Expression in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen keine Expressionsveränderungen von Genen festgestellt werden kann, die wichtig sind für die Musterbildung entlang der A/P-Achse. Die beobachtete Verringerung der *Gli1*-Expression in den Vordergliedmaßen von *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Embryonen kann nur schwer mit der auftretenden zentralen Polydaktylie korreliert werden. Ausgehend von der in Mausmutanten mit einer präaxialen Polydaktylie beschriebenen ektopischen *Shh*-Expression, die mit einer ektopischen Expression von *Gli1* und schließlich einer Aktivierung des Shh-Signalwegs verbundenen ist (MASUYA; H. ET AL. 1997; BÜSCHER, D.

ET AL. 1997), müßte es hier somit zu einer Verringerung der Shh-Aktivität kommen. Da das Auftreten einer Polydaktylie aber in der Regel mit einer Fehlexpression von *Shh* und einer Zunahme der Shh-Aktivität korreliert ist, ist die Relevanz der gefundenen verringerten *Gli1*-Expression unklar. Unterstützt wird dieses noch durch die Befunde in *Gli1*^{-/-}-Mäusen, die keinerlei Gliedmaßen-Phänotyp aufweisen (PARK, H. ET AL. 2000), so daß *Gli1* wahrscheinlich während der Gliedmaßenentwicklung nicht für die Weiterleitung des morphogenen Shh-Signals notwendig ist. Weiterhin konnten keine Veränderungen in der Expression anderer für die Gliedmaßenentwicklung wichtiger Gene festgestellt werden. Die auftretende zentrale Polydaktylie in *Gli3*^{Δ699/Δ699}-Tieren kann somit entweder durch eine so geringe Veränderung in der RNA-Expression einzelner oder mehrerer Gene verursacht werden, daß diese nicht durch die hier eingesetzte „Whole mount“ *in situ*-Hybridisierung nachweisbar ist (die in *Xt*^l-Tieren auftretende ektopische *Shh*-Expression läßt sich nur in homozygoten Embryonen nachweisen, jedoch nicht in heterozygoten, die ebenfalls eine präaxiale Polydaktylie zeigen; MASUYA; H. ET AL. 1997; BÜSCHER, D. ET AL. 1997), oder es findet eine Beeinflussung der ablaufenden Signalwege auf der Ebene der Proteine statt. Als weitere Möglichkeit können aber auch andere Faktoren der Fgf- (z.B. Fgf4), Bmp- (z.B. Bmp2; 6 oder 7) oder Hh-Familie zur Ausbildung der zentralen Polydaktylie beitragen. Besonders interessant wäre hier *Ihh*, da bereits gezeigt worden ist, daß es ähnlich Shh eine polarisierende Aktivität besitzt und eine ektopische Expression zur Ausbildung einer präaxialen Polydaktylie führen kann (HAYES, C. ET AL. 1998; YANG, Y. ET AL. 1998). Ausgehend von den molekularen Analysen des Gliedmaßen-Phänotyps ist somit die Auswirkung des C-terminal verkürzten *Gli3*-Proteins auf das genetische Netzwerk der Gliedmaßenentwicklung zur Zeit unklar.

Im Zusammenhang mit der in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Embryonen beobachteten Syndaktylie konnte als Ursache eine Verringerung des interdigitalen Zelltods gefunden werden. Der Auslöser für die deutliche Reduktion der Apoptose, die im interdigitalen Mesenchym von großer Wichtigkeit für die Separation und Ausformung der sich entwickelnden Finger ist (Übersicht bei CHEN, Y. UND ZHAO, X. 1998), ist jedoch unklar. Bisher ist noch keine Funktion von *Gli3* in der Regulation von Apoptose und besonders des programmierten Zelltods während der Gliedmaßenentwicklung beschrieben worden. Eine erste Analyse der Expression von *Bmp4* und *Msx2*, die beide eine wichtige Funktion in der Induktion und Regulation des programmierten Zelltods in der sich entwickelnden Extremität haben, ergab keine Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen.

4.4 Die Untersuchung der $Gli3^{\Delta699/XtJ}$ -Tiere

Die Untersuchung der $Gli3^{\Delta699/XtJ}$ -Tiere zeigte, daß diese einen imperforierten Anus und eine präaxiale Polydaktylie aufweisen. Darüber hinausgehend konnten die in homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Tieren beobachteten schweren Entwicklungsstörungen weder in $Gli3^{\Delta699/XtJ}$ - noch in $Gli3^{XtJ/XtJ}$ -Tieren gefunden werden. Hieraus ergibt sich, daß die beobachteten schweren Entwicklungsstörungen spezifisch für das $Gli3^{\Delta699}$ -Allel sind und daß das $Gli3^{XtJ}$ -Allel dominant über das $Gli3^{\Delta699}$ -Allel ist. Diese Dominanz wird allerdings durch das Auftreten des imperforierten Anus durchbrochen, der sonst nur in homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Tieren auftritt. Gleichzeitig kann aus diesen Analysen geschlossen werden, daß die Ausprägung der in homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Mäusen beobachteten Entwicklungsstörungen nur durch eine über einem Schwellenwert liegende Menge an mutiertem Gli3-Protein hervorgerufen werden können. Das heißt, daß es nicht ausreichend ist das Verhältnis zwischen Wildtyp- und $Gli3^{\Delta699}$ -Protein zugunsten des mutierten Proteins zu verschieben, indem man ein $Gli3^{\Delta699}$ -Allel mit einem Null ($Gli3^{XtJ}$)-Allel kombiniert, um die beobachteten phänotypischen Veränderungen hervorzurufen. Vielmehr darf zum Einen kein Wildtyp-Protein mehr in den Zellen vorliegen und es muß von beiden $Gli3^{\Delta699}$ -Allelen das mutierte Protein gebildet werden. Erst in dieser Situation ist genügend $Gli3^{\Delta699}$ -Protein in den Zellen vorhanden, um negativ auf die Entwicklung einzuwirken. Die Qualität und die Quantität des gebildeten Gli3-Proteins sind somit entscheidend für den beobachteten Phänotyp. Trotz der Abhängigkeit des beobachteten Phänotyps vom Vorhandensein beider mutierter $Gli3$ -Allele in den Tieren, handelt es sich nicht um ein rezessives $Gli3$ -Allel, da die heterozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Tiere einen Gliedmaßenphänotyp zeigen.

4.5 Die $Gli3^{\Delta699/\Delta699}$ -Mausmutante als Modell für das Pallister-Hall Syndrom

Die in homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Mäusen beobachteten phänotypischen Veränderungen, sowie die Betrachtung des in Tabelle 10 dargestellten Vergleiches der in homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Tieren und Pallister-Hall Syndrom-Patienten gefundenen Entwicklungsstörungen verdeutlichen, daß es sich bei diesen Tieren um ein Mausmodell (Phänokopie) des im Menschen beschriebenen Syndroms handelt. Es finden sich in allen Hauptmerkmalen des Pallister-Hall Syndromes Übereinstimmungen zwischen den beschriebenen Patienten, die häufig nur Teilaspekte oder stark abgeschwächte Ausprägungen des gesamten phänotypischen Spektrums (Übersicht bei Hall, J.G et al. 1980; BIESECKER, L.G. UND GRAHAM, J.M. JR. 1996) zeigen, und der homozygoten $Gli3^{\Delta699}$ -Mausmutante. Eine Ausnahme hiervon bildet allerdings das Auftreten von hypothalamischen Hamartomen, die

in PHS-Patienten jedoch nicht in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren gefunden werden können. Der hier beobachtete Unterschied im Auftreten eines embryonalen Tumors zwischen Mensch und Maus ist jedoch nicht ungewöhnlich. Zwischen den zwei Spezies bestehen deutliche Unterschiede in den der Tumorentwicklung zugrunde liegenden Mechanismen. Neben den unterschiedlichen Eigenschaften und Fähigkeiten der embryonalen Tumorstammzellen in den beiden Spezies spielt vorallem der genetische Hintergrund eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung bzw. bei der –suszeptibilität (PERA, M.F. ET AL. 1990; BALMAIN, A. UND NAGASE, H. 1998).

Eine weitere Auffälligkeit ist, daß die in der Maus beobachteten Entwicklungsstörungen nur im homozygoten Zustand des *Gli3*^{Δ699}-Allels auftreten, wohingegen beim Menschen aufgrund der Stammbaum-Analysen der familiären PHS-Fällen davon ausgegangen wird, daß es sich um ein autosomal dominant vererbtes Syndrom mit einer heterozygoten Mutation in *GLI3* handelt (KANG, S. ET AL. 1997; MIM 146510). Bisher konnte jedoch nicht einwandfrei gezeigt werden, daß in den untersuchten PHS-Patienten neben dem *GLI3*^{PHS}-Allel ein Wildtyp-Allel vorliegt. Trotz dieser Unsicherheiten über den Status der *GLI3*-Mutationen im Menschen stellt die hier gemachte Beobachtung keine Besonderheit dar. Derartige Unterschiede im Genotyp zwischen Mensch und Maus sind bereits für eine Vielzahl von Mausmutanten, die Tiermodelle für menschliche Fehlbildungserkrankungen darstellen, beschrieben worden. Derartige Dosis-Sensitivitäten, die eine Phänokopie der jeweiligen im heterozygoten Zustand auftretenden menschlichen Fehlbildungserkrankung nur im homozygoten Zustand der Mausmutation erlauben, konnten z.B. für *GATA3* (LIM, K.C. ET AL. 2000), *Lmx1b* (CHEN, H. ET AL. 1998), *Msx2* (SATOKATA, I. ET AL. 2000), *Pax9* (PETERS, H. ET AL 1998; SCHUFFENHAUSER, S. ET AL. 1999) und *Tbx1* (JEROME, L.A. UND PAPAIOANNOU, V.E. 2001) gefunden werden. Zusätzlich dazu sind aber auch Mutationen beschrieben, die im heterozygoten bzw. homozygoten Zustand in der Maus zu deutlich schwereren phänotypischen Veränderungen führen als im vergleichbaren Genotyp des Menschen (z.B. *Hlhx9*; HAGAN, D.M. ET AL. 2000 und *Sox9*; BI, W. ET AL. 2001). Derartige Befunde lassen sich zum Einen durch den Einfluß des genetischen Hintergrundes in der Maus erklären (siehe oben). Neben dem starken Einfluß des genetischen Hintergrundes, müssen aber auch noch andere Gründe für die beobachteten Unterschiede der Phänotypen zwischen Mensch und Maus in Betracht gezogen werden. Hierzu gehören z.B. die Redundanz oder Veränderungen biochemischer Synthese- oder Abbauwege, die Veränderung oder sogar das Fehlen bestimmter während der Embryonalentwicklung ablaufender Prozesse oder Signalwege und die im Vergleich zum Menschen kurze Lebenserwartung der Maus (Übersicht bei WYNshaw-BORIS, A. 1996). Zusätzlich können

noch Unterschiede im Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene während der Entwicklung einen entscheidenden Einfluß auf den im Menschen und der Maus beobachteten Phänotyp haben. Hierbei kann es wie z.B. bei *WNT7A/Wnt7a*, das als hochkonserviertes Gen mit entscheidenden Funktionen während der frühen Entwicklung angesehen wird, zu deutlichen zeitlichen wie auch räumlichen Unterschieden in der Expression während der Embryonalentwicklung kommen (FOUGEROUSSE, F. ET AL. 2000). Neben den Unterschieden in der zeitlichen und, durch anatomische Unterschiede verursachten, räumlichen Entwicklung der einzelnen betroffenen Strukturen kann dieses beobachtete veränderte Expressionsverhalten aber auch auf eine funktionale Differenz der Gene während der Embryonalentwicklung zwischen Mensch und Maus hindeuten (FOUGEROUSSE, F. ET AL. 2000). Aufgrund dieser Faktoren erscheint der in *Gli3*^{Δ699}-Mäusen und PHS-Patienten beobachtete Unterschied nicht von größerer Bedeutung zu sein. Insgesamt ist es eher positiv zu bewerten und von zunehmendem Interesse nicht nur die Gemeinsamkeiten, sondern auch die Unterschiede zwischen Mensch und Maus zu untersuchen. Hierdurch bietet sich die Möglichkeit den evolutionären Einfluß auf die Genfunktion während der normalen Entwicklung zu hinterfragen und modifizierende Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, um ihre Bedeutung für die normale Entwicklung zu analysieren.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß die in den homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren auftretenden phänotypischen Veränderungen alle ihren Ursprung in einem ES-Zellklon und einer davon abgeleiteten Keimbahn-Transmission aufweisenden chimären Maus haben. Es muß hier somit eingeräumt werden, daß die beobachteten Entwicklungsstörungen spezifisch für diesen verwendeten gezielt manipultierten Klon sein können. Diese Klon-Spezifität kann aufgrund des Fehlens einer zweiten unabhängigen Mauslinie, die denselben Phänotyp zeigt, nicht ausgeschlossen werden. Als mögliche Ursachen für die hier beobachteten Veränderungen könnte eine zusätzliche zweite unabhängige Mutation angeführt werden oder eine Beeinflussung benachbarter Gene durch die Mutation. Da der beobachtete Phänotyp in den homozygoten Tieren stabil auftritt, kann nicht von einer zusätzlichen Mutation auf einem anderen Chromosom ausgegangen werden, da diese Mutation im Verlauf der Analysen herausgekreuzt worden wäre. Das Vorhandensein einer eng gekoppelten Mutation kann jedoch nur durch weitere Rückkreuzungen ausgeschlossen werden (congener Stamm). Weiterhin wird die Etablierung der *Gli3*^{mPHS-neoflox}- bzw. *Gli3*^{mPAP-A-neoflox}-Mauslinien endgültigen Aufschluß über die Korrelation des hier beobachteten Phänotyps mit der vorliegenden Mutation im *Gli3*-Gen geben.

Da die hier etablierte *Gli3*^{Δ699}-Mauslinie aber eine sehr gute Phänokopie des im Menschen beobachteten Pallister-Hall Syndroms darstellt, können die Einwände als nicht schwerwiegend angesehen werden. Die Mauslinie kann als das Hilfsmittel angesehen werden, daß erforderlich ist, um die molekularen Veränderungen verschiedener Signalwege und genetischer Netzwerke, die zu den beobachteten Entwicklungsstörungen führen zu analysieren und die normale Genfunktion von *Gli3* während der Entwicklung zu verstehen. Außerdem stellt die *Gli3*^{Δ699}-Mausmutante ein wertvolles Werkzeug dar, das zum Verständnis der Pathomechanismen und der Pathophysiologie des Pallister-Hall Syndroms beitragen kann.

4.6 Das *Gli3*^{Δ699}-Protein und seine Funktion

Aufgrund der durchgeführten Analysen der in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren gefundenen Entwicklungsstörungen, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei der gezielt eingebrachten Mutation, die zu einer C-terminalen Verkürzung des Gli3-Proteins distal der Zink-Finger Region führt, um eine Zugewinn-Mutation handelt. Durch die Mutation wird aus dem Wildtyp-Protein ein potenter Repressor, der im Gegensatz zum normalen Gli3-Protein auf eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen negativ einwirkt. Dieser Befund stellt eine Übereinstimmung mit der in *Drosophila* beschriebenen Prozessierung von Ci dar, das ebenfalls als C-terminal verkürztes Protein in der Zellen als Repressor fungiert (siehe 1.1). Die Annahme, daß es sich bei dem Gli3^{Δ699}-Protein um einen potenten Repressor handelt wird durch die beobachteten Phänotypen, die vergleichende Untersuchung der homozygoten *Gli3*^{Δ699}-, *Gli3*^{Δ699/XtJ}- und *Gli3*^{XtJ/XtJ}-Tiere und die bereits in der Literatur beschriebenen *in vitro* Daten unterstützt.

Die Untersuchung der phänotypischen Veränderungen in homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren zeigt, daß Gli3^{Δ699} einen deutlichen negativen Einfluß auf die Entwicklung der jeweils betroffenen Struktur ausübt. Am Beispiel des Gastrointestinaltrakts zeigt sich, daß die gefundenen Veränderungen dem zuvor beschriebenen Phänotyp der *Ihh*^{-/-}-Mutation, daß zusammen oder parallel zu *Shh* wichtig ist für die Musterbildung bzw. Differenzierung des Gastrointestinaltrakts (RAMALHO-SANTOS, M. ET AL. 2001), entspricht. Das Gli3^{Δ699}-Protein verursacht hier eine effiziente Unterbrechung der erforderlichen Signalwege und führt zur Entwicklung der beobachteten schweren Störungen der Morphologie des Gastrointestinaltrakts. Daß es sich hierbei nicht nur einfach um den Verlust der normalen Gli3-Funktion handeln kann, die zur Ausprägung der schweren Entwicklungsstörungen führt, sondern um eine Verstärkung einer vorhandenen (oder durch die Mutation neu

hinzugekommenen) Gli3-Repressorfunktion handelt, wird durch die Untersuchung der homozygoten *Xt^l*-Mäuse deutlich. In diesen kommt es durch die *Gli3*-Mutation zu einem vollständigen Funktionsverlust des Gli3-Proteins. Dennoch entwickeln diese Tiere im Wesentlichen nur eine präaxiale Polydaktylie und Störungen der Entwicklung des ZNS. Darüber hinausgehend können keine der in homozygoten *Gli3^{Δ699}*-Tieren beobachteten schwerwiegenden Entwicklungsstörungen gefunden werden.

Zusätzlich zu diesen *in vivo* Daten sprechen auch eine ganze Reihe von *in vitro* Daten für eine starke Repressoraktivität des in *Gli3^{Δ699}*-Tieren gebildeten Proteins. Die Verwendung von Grundplatten- und Neuronen-Induktionsexperimenten im Frosch konnte zeigen, daß C-terminal verkürzte Gli3-Formen als starke Antagonisten wirken und die C-terminalen Sequenzen für positive induzierende Eigenschaften und die zytoplasmatische Lokalisation des Proteins benötigt werden. Im Gegensatz dazu sind N-terminale Sequenzen für eine nukleäre Lokalisation und dominat-negative Funktionen verantwortlich (RUIZ I ALTABA, A. 1999). Weiterhin zeigte diese Analyse eine Kontext-abhängige Funktion von Gli3, die teilweise in Abhängigkeit vom Gewebe aktivierend wie auch reprimierend sein kann. Ansätze dieser Umgebungs-abhängigen Funktion von Gli3 können auch aufgrund der Untersuchungen in *Gli3^{Δ699}*-Tieren vermutet werden. Weitere Experimente mit GLI3 im Zellkultursystem (DAI, P. ET AL. 1999; KALFF-SUSKE, M. ET AL. 1999) deuten auf eine Repressor-Domäne N-terminal der Zink-Finger Region und eine transaktivierende und CBP-bindende Region sowie zwei weitere transaktivierende Domänen distal der Zink-Finger Region hin. Außerdem befindet sich in dieser Region des GLI3-Proteins noch eine für die Proteinprozessierung erforderliche Region und die Konsensus-PKA-Phosphorylierungsstellen, die für eine eventuelle Prozessierung notwendig sind (WANG, B. ET AL. 2000).

Durch die hier vorliegende gezielt in das *Gli3*-Gen eingefügte Mutation kommt es demnach zu einer Deletion der transaktivierenden Domänen und zu einem Verlust der CBP-interagierenden Domäne, so daß im *Gli3^{Δ699}*-Protein nur die Repressor-Domäne und die Zink-Finger erhalten bleiben. Insgesamt kann somit davon ausgegangen werden, daß das *Gli3^{Δ699}*-Protein ein starker Repressor ist. Die weiteren morphologischen und molekularen Untersuchungen der *Gli3^{Δ699}*-Mäuse können zur Aufklärung der Funktion eines unter normalen Bedingungen durch Prozessierung entstehenden C-terminal verkürzten Gli3-Proteins während der normalen Entwicklung beitragen. Die *Gli3^{Δ699}*-Mutante bietet sich hierfür besonders an, da hier keine Überlagerung der Funktion des C-terminal verkürzten Proteins durch andere Gli3-Proteinformen (Gesamtlängenprotein) vorliegt.

5 Zusammenfassung

Gli-Proteine agieren als der letzte bekannte Schritt des Shh-Signalweges. Sie sind an der Determinierung und Proliferation sowie der Musterbildung einer Vielzahl von Zellen und Organen beteiligt. Ihre Fehlfunktion ist mit verschiedenen Erkrankungen einschließlich der Tumorentstehung verbunden.

Gli3 nimmt unter den Mitglieder eine besondere Stellung ein. In der Maus sind vier allelische phänotypisch ähnliche Mutanten beschrieben, die durch das Auftreten einer präaxialen Polydaktylie und Störungen der Entwicklung des ZNS charakterisiert sind. Im Menschen sind 25 Mutationen in *GLI3* bekannt, die zu vier verschiedenen phänotypischen Ausprägungen führen. Hierunter sind zwei schwere Fehlbildungssyndrome (GCPS, MIM 175700 und PHS, MIM 146510) und zwei Fehlbildungserkrankungen mit isolierten Gliedmaßen-Phänotypen (PPDIV, MIM 174700 und PAP-A bzw –A/B, MIM 174200) zu finden. In allen vier mit *GLI3* assoziierten Erkrankungen kommt es zu einem Auftreten einer Polydaktylie, diese zeigen jedoch deutliche qualitative Unterschiede (präaxial, zentral, postaxial). Um die zugrunde liegenden molekularen Veränderungen, die durch Mutationen in *Gli3* zur Ausbildung von unterschiedlichen Polydaktylie-Formen in vier verschiedenen Fehlbildungserkrankungen führen, zu untersuchen, wurden zwei der im Menschen identifizierten Mutationen und eine zwischen diesen liegende durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen der Maus in das *Gli3*-Gen eingefügt. Neben der Etablierung der embryonalen Stammzellen, die die Leserastermutation 2194delA (PHS) bzw. 2463delG (PAP-A) tragen, konnte eine Mausmutante mit einer gezielten Veränderung des *Gli3*-Gens erhalten werden. In den Tieren dieser Mauslinie kommt es durch die gezielte Manipulation von *Gli3* (Pos. 2402) zur Ausbildung eines für 699 Aminosäuren kodierenden Transkripts. Das hieraus abgeleitete Protein weist eine distal der Zink-Finger gelegene C-terminale Verkürzung auf, die zur Deletion der transaktivierenden Domänen und der CBP-interagierenden Domäne führt und die Zink-Finger Region sowie eine N-terminale Repressor-Domäne im Protein belässt. Durch die *Gli3*^{Δ699}-Mutation kommt es zu schweren Störungen der Embryonalentwicklung in den Mäusen und zur Manifestation einer Polyphänie. Die Tiere zeigen im heterozygoten Zustand mit geringer Frequenz die Bildung einer postaxialen Polydaktylie. Die homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tiere sind neonatal letal und weisen neben einer zentralen Polydaktylie eine Syndaktylie und eine deutliche proximo-distale Verkürzung der Gliedmaßen sowie eine Dysplasie der Nägel auf. Zusätzlich zu den Fehlbildungen des Extremitätenskeletts treten weitere schwere Entwicklungsstörungen auf. So ist in diesen Tieren die Entwicklung der Wirbelsäule, der

Schädelbasis, des Kehlkopfes, des Anus und des Gastrointestinaltrakts sowie der Nieren und Nebennieren durch die Mutation betroffen.

Die genaue Betrachtung der in den homozygoten *Gli3*^{Δ699}-Tieren gefundenen Entwicklungsstörungen verdeutlicht, daß es sich bei dieser Mutation um eine Zugewinn-Mutation handelt und daß das entstehende Protein als ein potenter Repressor auf eine Vielzahl von wichtigen Entwicklungsprozessen einwirkt. Weiterhin ergibt sich aus dem Vergleich der beschriebenen Entwicklungsstörungen, daß die *Gli3*^{Δ699}-Mausmutante ein Mausmodell für das menschliche Pallister-Hall Syndrom darstellt.

Literatur

Akimaru, H., Chen, Y., Dai, P., Hou, D.X., Nonaka, M., Smolik, S.M., Armstrong, S., Goodman, R.H. und Ishii, S. 1997

Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling.
Nature 386:735-738

Alcedo, J. und Noll, M. 1997

Hedgehog und Patched-Smoothed receptor complex: a novel signalling mechanism at the cell surface.
Biol Chem. 378:583-590

Alcedo, J., Zou, Y. und Noll, M. 2000

Posttranscriptional regulation of smoothed is part of a self-correcting mechanism in the Hedgehog signaling system.
Mol Cell. 6:457-65

Amores, A., Force, A., Yan, Y.L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.L., Westerfield, M., Ekker, M. und Postlethwait, J.H. 1998

Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution.
Science 282:1711-1714

Antonarakis, S.E. und McKusick, V.A. 2000

OMIM passes the 1,000-disease-gene mark.
Nat Genet. 25:11

Aparicio, S. 1998

Exploding vertebrate genomes.
Nat Genet. 18:301-3

Apelqvist, A., Ahlgren, U. und Edlund, H. 1997

Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas.
Curr Biol. 7:801-804

Aruga, J., Mizugishi, K., Koseki, H., Imai, K., Balling, R., Noda, T. und Mikoshiba, K. 1999

Zic1 regulates the patterning of vertebral arches in cooperation with Gli3.
Mech Dev. 89:141-150

Asher JH Jr, Harrison RW, Morell R, Carey ML, und Friedman TB. 1996

Effects of Pax3 modifier genes on craniofacial morphology, pigmentation, and viability: a murine model of Waardenburg syndrome variation.
Genomics. 34:285-298

Askew, G.R., Doetschman, T., Lingrel, J.B. 1993

Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy.
Mol Cell Biol. 13:4115-4124

Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F.A., Laget, M.P., Schwartz, C. und Kornberg, T.B. 1997

Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor.
Cell 89, 1043-1053

- Aza-Blanc, P. und Kornberg, T.B. 1999
Ci – a complex transducer of the Hedgehog signal.
Trends Genet. 15:458-462
- Aza-Blanc, P., Lin, H.Y., Ruiz i Altaba, A.und Kornberg T.B., 2000
Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveals a distribution of activator and repressor activities.
Development.127:4293-4301
- Baeg, G.-H. und Perrimon, N. 2000
Functional binding of secreted molecules to heparan sulfate proteoglycans in Drosophila.
Curr. Opin. Cell Biol. 12:575-580
- Balmain, A. und Nagase, H. 1998
Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumour modifiers.
Trend Genet 14:139-144
- Bedell, M. A., Jenkins, N. A., und Copeland, N. G. 1997a.
Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice.
Genes & Dev. 11:1-10
- Bedell, M. A., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., und Copeland, N. G. 1997b.
Mouse models of human disease. Part II: Recent Progress and future directions.
Genes & Dev. 11:11-43
- Bellus GA, McIntosh I, Smith EA, Aylsworth AS, Kaitila I, Horton WA, Greenhaw GA, Hecht JT, und Francomano CA. 1995
A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia.
Nat Genet. 10:357-359
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R. und de Crombrughe, B. 1999
Sox9 is required for cartilage formation.
Nat Genet. 22:85-89
- Biesecker, L.G. und Graham, J.M. Jr. 1996
Pallister-Hall syndrome.
J Med Genet. 33:585-589.
- Biesecker, L.G. 1997
Strike three for GLI3.
Nat Genet. 17:259-260
- Birnboil, H. C. und Doly, J. 1979.
A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plamid DNA.
Nucl. Acids. Res. 7:1513-1522
- Birnboil, H. C. 1983
A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA
Methods Enzymol. 100:243-255

- Böse, J. 1997
Mutagenese des Maus Gli3-Gens.
Diplomarbeit; Universität Hannover, Fachbereich Biologie
- Borycki, A.-G., Mendham, L. und Emerson, C.P. Jr. 1998
Control of somite patterning by Sonic hedgehog and its downstream signal response genes.
Development 125:777-790
- Borycki, A.-G., Brown, A.M.C. und Emerson Jr, C.P. 2000
Shh and Wnt signaling pathways converge to control Gli gene activation in avian somites.
Development 127:2075-2087
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, und Robertson E. 1984
Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines.
Nature. 309:255-256
- Brandon, E. P., Idzerda, R. L., und McKnight, G. S. 1995
Targeting the mouse genome: a compendium of Knockouts (part I-III)
Current Biology 5:625-634 & 758-765 & 873-881
- Brewster, R., Mullor, J.L. und Ruiz i Altaba, A 2000
Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning.
Development 127:4395-4405
- Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, und Struhl G. 2001
A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube.
Mol Cell. 7:1279-1291
- Brown, R. S., Sander, C., und Argos, P. 1985.
The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats.
FEBS Lett. 186:271-274
- Brown, S.D. und Balling, R. 2001
Systematic approaches to mouse mutagenesis.
Curr Opin Genet Dev. 11:268-273
- Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. und Harland, R.M. 1998
Noggin, Cartilage Morphogenesis, and Joint Formation in the Mammalian Skeleton.
Science 280:1455-1457
- Büscher, D., Bosse, B., Heymer, J. und Rüther, U., 1997
Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development.
Mech Dev.62:175-182
- Büscher, D. und Rüther U., 1998
Expression profile of Gli family members and Shh in normal and mutant mouse limb development.
Dev Dyn.211:88-96

- Büscher, D., Grotewold, L. und Rüther, U. 1998
The XtJ allele generates a Gli3 fusion transcript.
Mamm Genome 9:676-678
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.-A., Dickson, B.J. und Basler, K. 1999
Dispatched, a novel sterol sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified Hedgehog from signaling cells.
Cell 99:803-815
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S., Bianchi, M.E. 1999
The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice.
Nat Genet. 22:276-280
- Capano, C.P., Pernas-Alonso, R. und di Porzio, U. 2001
Neurofilament homeostasis and motoneuron degeneration.
BioEssays 23:24-33
- Chakravarti, A. 1996
Endothelin receptor-mediated signaling in hirschsprung disease.
Hum Mol Genet. 5:303-307
- Charite, J., McFadden, D.G. und Olson, E.N. 2000
The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development.
Development. 127:2461-2470
- Chen, C.H., von Kessler, D.P., Park, W., Wang, B., Ma, Y. und Beachy, P.A. 1999
Nuclear trafficking of Cubitus interruptus in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression.
Cell 98:305-316
- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K.C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B. und Johnson, R.L. 1998
Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome.
Nat Genet. 19:51-55
- Chen, Y. und Struhl, G. 1996
Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog.
Cell 87:553-563
- Chen, Y. und Zhao, X. 1998
Shaping limbs by Apoptosis.
J Exp Zoo 282:691-702
- Chen, Y., Gallaher, N., Goodman, R.H. und Smolik, S.M. 1998
Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus.
Proc Natl Acad Sci U S A 95:2349-2354

- Chen, Y., Yee, D., Dains, K., Chatterjee, A., Cavalcoti, J., Schneider, E., Om, J., Woychik, R.P. und Magnusson, T. 2000
Genotype-based screen for ENU-induced mutations in mouse embryonic stem cells.
Nat. Genet. 24:314-317
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., und Beachy, P. A. 1996
Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* function.
Nature 383:407-413
- Chuang, P.T. und McMahon, A.P. 1999
Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein.
Nature 397:617-621
- Church, G.M. und Gilbert, W. 1984
Genomic sequencing.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991
- Cohn MJ, und Tickle C. 1996
Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan.
Trends Genet. 12:253-257
- Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, und Ornitz DM. 1996
Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3.
Nat Genet. 12:390-397
- Cunliffe, V. und Smith, J.C. 1992
Ectopic mesoderm formation in *Xenopus* embryos caused by widespread expression of a Brachyury homologue.
Nature 358:427-430
- Dahmane, N., Lee, J., Robins, P., Heller, P. und Ruiz i Altaba, A., 1997
Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours.
Nature.389:876-881
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M. und Ishii, S., 1999
Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3.
J Biol Chem.274:8143-8152
- Denef, N., Neubuser, D., Perez, L. und Cohen, S.M. 2000
Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened.
Cell 102:521-531
- Dent, J.A., Polson, A.G. und Klymkowsky, M.W. 1989
A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*.
Development 105:61-74
- Ding Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J. und Hui, C.C., 1998
Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice.
Development.125:2533-2543

- Ding, Q., Fukami, Si., Meng, X. Nishizaki, Y., Zhang, X., Sasaki, H., Dlugosz, A., Nakafuku, M. und Hui Cc., 1999
 Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1.
 Curr Biol.9:1119-1122
- Doolittle, D.P., Davisson, M. T., Guidi, J. N. und Green, M. C. 1996
 Catalog of mutant genes and polymorphic loci.
 In: Genetic variants and strains of the laboratory mouse. 3rd ed.
 (ed. Lyon, M. F., Rastan, S., and Brown, S. D. M.), pp. 17-854.
 Oxford University Press, Oxford, UK
- Drossopoulou G, Lewis KE, Sanz-Ezquerro JJ, Nikbakht N, McMahon AP, Hofmann C, und Tickle C. 2000
 A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling.
 Development. 127:1337-1348
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A. und McMahon, A.P. 1993
 Sonic Hedgehog, a Member of a Family of Putative Signaling Molecules, Is Implicated in the Regulation of CNS Polarity.
 Cell 75:1417-1430
- Ellison, A.R., West, J.D., Spears, N., Murray, A., Everett, C.A. und Bishop, J.O. 2000
 Failure of founder transgenic male mice to transmit an attenuated HSV thymidine kinase transgene results from mosaicism and sperm competition.
 Mol Reprod Dev. 55:249-255
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, und Jessell TM. 1996
 Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity.
 Cell. 87:661-73
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, und Briscoe J. 1997
 Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling.
 Cell. 90:169-180
- Epstein, D.J., Marti, E., Scott, M.P. und McMahon, A.P. 1996
 Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway.
 Development 122:2885-2894
- Favier B, und Dolle P. 1997
 Developmental functions of mammalian Hox genes.
 Mol Hum Reprod. 3:115-131
- Fawcett D, Pasceri P, Fraser R, Colbert M, Rossant J, und Giguere V. 1995
 Postaxial polydactyly in forelimbs of CRABP-II mutant mice.
 Development. 121:671-679

Fernandez-Teran M, Piedra ME, Kathiriya IS, Srivastava D, Rodriguez-Rey JC, und Ros MA. 2000
Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway.
Development. 127:2133-2142

Festing MF, Simpson EM, Davisson MT, Mobraaten LE. 1999
Revised nomenclature for strain 129 mice.
Mamm Genome. 10:836

Fougerousse F, Bullen P, Herasse M, Lindsay S, Richard I, Wilson D, Suel L, Durand M, Robson S, Abitbol M, Beckmann JS und Strachan T. 2000
Human-mouse differences in the embryonic expression patterns of developmental control genes and disease genes.
Hum Mol Genet. 9:165-173

Frohman MA, und Martin GR. 1989
Cut, paste, and save: new approaches to altering specific genes in mice.
Cell. 56:145-147

Fung-Leung WP, und Mak TW. 1992
Embryonic stem cells and homologous recombination.
Curr Opin Immunol. 4:189-194

Galasso, C., Scire, G., Fabbri, F., Spadoni, G.L., Killoran, C.E., Biesecker, L.G. und Boscherini, B. 2001
Long-term treatment with growth hormone improves final height in a patient with Pallister-Hall syndrome.
Am J Med Genet.99:128-131

Gallet, A., Angelats, C., Kerridge, S. und Thérond, P.P. 2000
Cubitus interruptus-independent transduction of the Hedgehog signal in Drosophila.
Development 127:5509-5522

Gavriale, Y., Sherman, Y. und Ben-Sasson, S.A. 1992
Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.
J. Cell Biol. 119:493-501

Goodman FR, und Scambler PJ. 2001
Human HOX gene mutations.
Clin Genet. 59:1-11

Grabin-Botton A, und Melton DA. 2000
Endoderm development: from patterning to organogenesis.
Trends Genet. 16:124-130

Hagan DM, Ross AJ, Strachan T, Lynch SA, Ruiz-Perez V, Wang YM, Scambler P, Custard E, Reardon W, Hassan S, Nixon P, Papapetrou C, Winter RM, Edwards Y, Morrison K, Barrow M, Cordier-Alex MP, Correia P, Galvin-Parton PA, Gaskill S, Gaskin KJ, Garcia-Minaur S, Gereige R, Hayward R, und Homfray T. 2000
Mutation analysis and embryonic expression of the HLXB9 Currarino syndrome gene.
Am J Hum Genet. 66:1504-1515

- Hammerschmidt, M., Bitgood, M.J. und McMahon, A.P. 1996
Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo.
Genes Dev. 10:647-658
- Hammerschmidt, M., Brook, A. und McMahon, A.P. 1997
The world according to hedgehog.
Trends Genet. 13:14-21
- Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C.C. und Sharpe, P.T., 1998
The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants.
Development. 125:2803-2811
- Hatano O, Takakusu A, Nomura M, und Morohashi K. 1996
Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1.
Genes Cells. 1:663-671
- Hayasaka, I., Nakatsuka, T., Fujii, T., und Oda, S. 1980
Polydactyly Nagoya, Pdn: a new mutant gene in the Mouse.
Exp. Anim. 29:391-395
- Hayes, C., Brown, J.M., Lyon, M.F. und Morriss-Kay, G.M. 1998
Sonic hedgehog is not required for polarising activity in the Doublefoot mutant mouse limb bud.
Development 125:351-357
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., und Lacy, E. 1994
Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual. 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. und Monk, M. 1987
HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells
Nature 326:292-295
- Hormuzdi, S.G., Penttinen, R., Jaenisch, R. und Bornstein, P.A 1998
A gene-targeting approach identifies a function for the first intron in expression of the alpha1(I) collagen gene.
Mol Cell Biol. 18:3368-3375
- Hui, C.C. und Joyner, A.L., 1993
A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene.
Nat Genet. 3:241-246
- Hui, C. C., Slusarski, D., Platt, K. A., Holmgren, R., und Joyner, A. L. 1994
Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development.
Dev. Biol. 162:402-413
- Hynes, M., Stone, D.M., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Goddard, A., Gurney, A. und Rosenthal, A. 1997
Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1.
Neuron 19:15-26

- Ingham, P.W. 1998
Transducing Hedgehog: the story so far.
EMBO J. 17:3505-3511
- Ingham, P.W., Nystedt, S., Nakano, Y., Brown, W., Stark, D., van den Heuvel, M. und Taylor, A.M. 2000
Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein.
Curr Biol. 10:1315-1318
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. 1990
High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.
Gene 96: 23-28
- Iwata, T., Chen, L., Li, C., Ovchinnikov, D.A., Behringer, R.R., Francomano, C.A. und Deng, C.X. 2000
A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. Hum Mol Genet 9:1603-1613
- Jerome LA, und Papaioannou VE. 2001
DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1.
Nat Genet. 27:286-291
- Jiang, J. und Struhl, G. 1998
Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb.
Nature 391:493-496
- Jimenez-Sanchez, G., Childs, B. und Valle, D. 2001
Human disease genes.
Nature 409:853-855
- Johnson, D. R. 1967
Extra-toes: a new mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse.
J. Embryol. exp. Morph. 17:543-581
- Johnson, D. R. 1969
Brachyphalangy: An allele of *Extra-toes* in the mouse
Genet. Res. Camb. 13:275-280
- Johnson KR, Sweet HO, Donahue LR, Ward-Bailey P, Bronson RT, und Davisson MT. 1998
A new spontaneous mouse mutation of Hoxd13 with a polyalanine expansion and phenotype similar to human synpolydactyly.
Hum Mol Genet. 7:1033-1038
- Johnson, R.L. und Tabin, C.J. 1997
Molecular models for vertebrate limb development.
Cell 90:979-990
- Joyner, A. L. 1999
Gene targeting : A practical approach
Oxford University Press Inc.

Kalderon, D. 2000

Transducing the Hedgehog Signal.

Cell 103:371-374

Kalff-Suske, M., Wild, A., Topp, J., Wessling, M., Jacobsen, E.M., Bornholdt, D., Engel, H., Heuer, H., Aalfs, C.M., Ausems, M.G., Barone, R., Herzog, A., Heutink, P., Homfray, T., Gillesen-Kaesbach, G., Konig, R., Kunze, J., Meinecke, P., Muller, D., Rizzo, R., Streng, S., Superti-Furga, A. und Grzeschik, K.H., 1999
Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome.

Hum Mol Genet.8:1769-1777

Kang, S., Graham, J.M. Jr, Olney, A.H. und Biesecker, L.G., 1997a

GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome.

Nat Genet.15:266-268

Kang, S., Rosenberg, M., Ko, V.D. und Biesecker, L.G., 1997b

Gene structure and allelic expression assay of the human GLI3 gene.

Hum Genet.101:154-157

Kingsley, D.M. 1994

The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms.

Genes Dev. 8: 133-146

Kinzler, K. W., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., und Vogelstein, B. 1988.

The *GLI* gene is a member of the *Krüppel* family of zinc finger proteins.

Nature 332:731-734

Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. 1990

The *GLI* gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome.

Mol. Cell. Biol. 10:634-642

Knecht, T.P. und Glass, C.K. 1995

The influence of molecular biology on our understanding of lipoprotein metabolism and the pathobiology of atherosclerosis.

Adv Genet. 32:141-198

Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Unden, A.B., Sandstedt, B., Toftgard, R. und Zaphiropoulos, P.G. 1999

Mammalian Suppressor-of-Fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of GLI-1

Nat. Cell Biol. 1:312-319

Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, Hagaman JR, Huang S, Williams PJ, First NL, Maeda N, und Smithies O. 1989

Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 86:8927-8931

Kraus, P., Fraidenraich, D. und Loomis, C.A. 2001

Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling.

Mech Dev. 100:45-58

- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, und Jaenisch R. 1993
WT-1 is required for early kidney development.
Cell. 74:679-691
- Krishnan, V., Elberg, G., Tsai, M.J. und Tsai, S.Y. 1997a
Identification of a novel sonic hedgehog response element in the chicken ovalbumin upstream promotor-transcription factor II promotor.
Mol. Endocrinol. 11:1458-1466
- Krishnan, V., Pereira, F.A., Qiu, Y., Chen, C.H., Beachy, P.A., Tsai, S.Y. und Tsai, M.J. 1997b
Mediation of Sonic hedgehog-induced expression of COUP-TFII by a protein phosphatase.
Science 278:1947-1950
- Kronenberg, H.M. und Chung, U. 2001
The parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog feedback loop in the growth plate.
Novartis Found Symp 232:144-152; 152-157
- Kühl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C. und Moon, R.T. 2000
Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fate in *Xenopus*.
J Biol Chem 275:12701-12711
- Kühn, R., Rajewsky, W. und Müller, W. 1991
Generation and analysis of Interleukin-4 deficient mice.
Science 254:707-710
- Lanes, R., Blanchette, V. Chandra, E. Zahka, K. Lee, P.A., Pakula, L.C., MacLean, W.C. und Plotnick, L.M. 1978
Congenital hypopituitarism and conjugated hyperbilirubinemia in two infants.
Am J Dis Child 132:926-927
- Lawrence, P.A. und Struhl, G 1996
Morphogenes, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*?
Cell 85:951-961
- Lee, J., Platt, K.A., Censullo, P. und Ruiz i Altaba, A., 1997
Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development.
Development. 124:2537-2552
- LeMotte, P.K., Kuroiwa, A., Fessler, L.I. und Gehring W. 1989
The homeotic gene Sex Combs Reduced of *Drosophila*: gene structure and embryonic expression.
EMBO J. 8: 219-227
- Lessing, D. und Nusse, R. 1998
Expression of wingless in the *Drosophila* embryo: a conserved cis-acting element lacking conserved Ci-binding sites is required for patched-mediated repression.
Development 125:1469-1476
- Lettice LA, Purdie LA, Carlson GJ, Kilanowski F, Dorin J, und Hill RE. 1999
The mouse bagpipe gene controls development of axial skeleton, skull, and spleen.
Proc Natl Acad Sci U S A. 96:9695-9700

Lewis, K.E., Drossopoulou, G., Paton, I.R., Morrice, D.R., Robertson, K.E., Burt, D.W., Ingham, P.W. und Tickle, C. 1999
Expression of *ptc* and *gli* genes in *talpid3* suggests bifurcation in Shh pathway.
Development 126:2397-2407

Lewis, P.M., Dunn, M.P., McMahon, J.A., Logan, M., Martin, J.F., St-Jacques, B. und McMahon, A.P. 2001
Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by *ptc1*.
Cell 105:599-612

Lim KC, Lakshmanan G, Crawford SE, Gu Y, Grosveld F, und Engel JD. 2000
Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system.
Nat Genet. 25:209-212

Linder CC. 2001
The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases.
Lab Anim (NY). 30:34-39

Litingtung, Y., Lei, L., Westphal, H. und Chiang, C. 1998
Sonic hedgehog is essential to foregut development.
Nat Genet 20:58-61

Litingtung, Y. und Chiang, C., 2000
Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3.
Nat Neurosci.3:979-985

Liu, F., Massague, J. und Ruiz i Altaba, A. 1998
Carboxy-terminally truncated Gli3 proteins associate with Smads.
Nat Genet. 20:325-326

Manouvrier-Hanu S, Holder-Espinasse M, und Lyonnet S. 1999
Genetics of limb anomalies in humans.
Trends Genet. 15:409-417

Mansour, S. L., Thomas, K. R., und Capecchi, M. R. 1988
Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes.
Nature 336:348-352

Marigo, V., Johnson, R.L., Vortkamp, A. und Tabin, C.J., 1996
Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development.
Dev Biol.180:273-283

Marine JC, Bellefroid EJ, Pendeville H, Martial JA, Pieler T. 1997
A role for *Xenopus* Gli-type zinc finger proteins in the early embryonic patterning of mesoderm and neuroectoderm.
Mech Dev. 63:211-225

- Marshall, E. 2001
Genome sequencing. Celera assembles mouse genome; public labs plan new strategy.
Science 292:822
- Martin GR. 19981
Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 78:7634-7638
- Mason, I.J. 1994
The ins and outs of fibroblast growth factors.
Cell 78:547-552
- Masuya, H., Sagai, T., Wakana, S., Moriwaki, K., und Shiroishi, T. 1995
A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants.
Genes & Dev. 9:1645-1653
- Masuya, H., Sagai, T., Moriwaki, K.und Shiroishi, T., 1997
Multigenic control of the localization of the zone of polarizing activity in limb morphogenesis in the mouse.
Dev Biol.182:42-51
- Matise, M.P., Epstein, D.J., Park, H.L., Platt, K.A.und Joyner, A.L., 1998
Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system.
Development.125:2759-2770
- Matise, M.P. und Joyner, A.L. 1999
Gli genes in development and cancer.
Oncogene 18:7852-7859
- McLaren, A. 1976
Genetics of the early mouse embryo.
Annu Rev Genet. 10:361-388
- McMahon, A.P. 2000
More surprises in the Hedgehog signaling pathway.
Cell 100:185-188
- Methot, N. und Basler, K. 1999
Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus.
Cell 96:819-831
- Method, N. und Basler, K. 2001
An absolute requirement for Cubitus interruptus in Hedgehog signaling.
Development 128:733-742
- Meyers EN, Lewandoski M, und Martin GR. 1998
An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination.
Nat Genet. 18:136-141

- Miller, J., McLachlan, A. D., und Klug, A. 1985.
 Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes.
 EMBO J. 4:1609-1614
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, und Aizawa S. 1997
 Defects of urogenital development in mice lacking Emx2.
 Development. 124:1653-1664
- Mo, R., Freer, A.M., Zinyk, D.L., Crackower, M.A., Michaud, J., Heng, H.H., Chik, K.W., Shi, X.M., Tsui, L.C.,
 Cheng, S.H., Joyner, A.L.und Hui, C., 1997
 Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development.
 Development.124:113-123
- Montagutelli X. 2000
 Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations.
 J Am Soc Nephrol. 11 Suppl 16:S101-105
- Montgomery RK, Mulberg AE, und Grand RJ. 1999
 Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress.
 Gastroenterology. 116:702-731
- Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, und Schedl A. 1999
 YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and
 throughout nephrogenesis.
 Development. 126:1845-1857
- Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore
 K, und Rosenthal A. 1996
 Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF.
 Nature. 382:76-79
- Motoyama, J., Liu, J., Mo, R., Ding, Q., Post, M.und Hui C.C., 1998
 Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus.
 Nat Genet.20:54-57
- Muenke M, und Schell U. 1995
 Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders.
 Trends Genet. 11:308-313
- Murone, M., Luoh, S.M., Stone, D., Li, W., Gurney, A., Armanini, M., Grey, C., Rosenthal, A.und de Sauvage
 F.J., 2000
 Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused.
 Nat Cell Biol.2:310-312
- Müller, U.1999
 Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis.
 Mech Dev. 82:3-21

- Mullor, J.L., Dahmane, N. Sun, T. und Ruiz i Altaba, A. 2001
Wnt signals are targets and mediators of Gli function.
Curr Biol 11:769-773
- Nadeau JH. 2001
Modifier genes in mice and humans.
Nat Rev Genet. 2:165-174
- Nagy, A. 2000
Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring.
Genesis 26:99-109
- Naruse, I., und Kameyama, Y. 1982
Morphogenesis of genetic preaxial polydactyly, *Polydactyly Nagoya, Pdn*, in mice.
Cong. Anom. 22:137-144
- Nemzek WR, Brodie HA, Hecht ST, Chong BW, Babcook CJ, und Seibert JA. 2000
MR, CT, and plain film imaging of the developing skull base in fetal specimens.
AJNR Am J Neuroradiol. 21:1699-1706
- Neumann, C. und Cohen, S. 1997
Morphogens and pattern formation.
BioEssays 19,721-729
- Nguyen PV, Abel T, Kandel ER, und Bourtchouladze R. 2000
Strain-dependent differences in LTP and hippocampus-dependent memory in inbred mice.
Learn Mem. 7:170-179
- Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E. 1980
Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*
Nature 287:795-801
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. und Kluding, H. 1984
Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* I Zygotic loci on the second chromosome.
Roux's Arch. Dev. Biol. 193:267-282
- Ohlmeyer, J.T. und Kalderon, D. 1998
Hedgehog stimulates maturation of *Cubitus interruptus* into a labile transcriptional activator.
Nature 396:749-753
- Opitz, J.M. und Howe, J.J. 1967
The Meckel syndrome (dysencephalia splanchnocystica, the Gruber syndrome).
BDOAS 5:167-169
- Park, H.L., Bai, C., Platt, K.A., Matise, M.P., Beeghly, A., Hui, C.C., Nakashima, M. und Joyner, A.L. 2000
Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a *Gli2* mutation.
Development 127:1593-1605
- Pavletich, N. P., und Pabo, C. O. 1993

Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: New perspectives on zinc fingers.
Science 261:1701-1707

Pearse, R.V. und Tabin, C.J. 1998
The molecular ZPA.
J Exp Zool. 282:677-690

Pera, M.F., Roach, S. und Elliss, C.J. 1990
Comparative biology of mouse and human embryonal carcinoma.
Cancer Surv 9:243-262

Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, und Balling R. 1998
Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities.
Genes Dev. 12:2735-2747

Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, und Westphal H. 1996
Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF.
Nature. 382:73-76

Pizette S, und Niswander L. 1999
BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge.
Development. 126:883-894

Platt, K. A., Michaud, J., und Joyner, A. L. 1997
Expression of the mouse *Gli* and *Ptc* genes is adjacent to embryonic sources of hedgehog signals suggesting a conservation of pathways between flies and mice.
Mech. Dev. 62:121-135

Pohl, T. M., Mattei, M. G., und Rüther, U. 1990
Evidence for allelism of the recessive insertional mutation *add* and the dominant mouse mutation *extra-toes (Xt)*.
Development 110:1153-1158

Porter, J.A., Young, K.E. und Beachy, P.A. 1996
Cholesterol modification of Hedgehog signaling proteins in animal development.
Science 274:255-259

Radhakrishna, U., Blouin, J.L., Mehenni, H., Patel, U.C., Patel, M.N., Solanki, J.V. und Antonarakis, S.E. 1997a
Mapping one form of autosomal dominant postaxial polydactyly type A to chromosome 7p15-q11.23 by linkage analysis.
Am J Hum Genet. 60:597-604

Radhakrishna, U., Wild, A., Grzeschik, K.H. und Antonarakis, S.E., 1997b
Mutation in *GLI3* in postaxial polydactyly type A.
Nat Genet. 17:269-271

- Radhakrishna, U., Bornholdt, D., Scott, H.S., Patel, U.C., Rossier, C., Engel, H., Bottani, A., Chandal, D., Blouin, J.L., Solanki, J.V., Grzeschik, K.H. und Antonarakis, S.E., 1999
The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations.
Am J Hum Genet. 65:645-655
- Ramalho-Santos M, Melton DA, und McMahon AP. 2000
Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development.
Development. 127:2763-2772
- Ramírez-Solis, R., Rivera-Pérez, J., Wims, M., Wallace, J.D., Zheng, H., und Bradley A. 1992
Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples.
Anal Biochem 201:331-335
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E. und Tabin, C. 1993
Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA.
Cell. 75:1401-1416
- Rimoin, D. und Schimke, R. 1971
Genetic disorders of the Endocrine Glands.
St Louis: C V Mosby
- Roberts DJ, Smith DM, Goff DJ, und Tabin CJ. 1998
Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut.
Development. 125:2791-2801
- Roberts DJ. 2000
Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract.
Dev Dyn. 219:109-120
- Roberts, W. M., Douglass, E. C., Peiper, S. C., Houghton, P. J. und Look, A. T. 1989
Amplification of the *GLI* gene in childhood sarcomas.
Cancer Res. 49:5407-5413
- Robertson, E. 1989
Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach
IRL Press Limited; England
- Ruiz i Altaba, A. 1997
Catching a Gli-mpse of hedgehog.
Cell 90:193-196
- Ruiz i Altaba, A. 1999
Gli proteins and Hedgehog signalling: development and cancer.
Trends Genet 15:418-425
- Ruiz i Altaba, A. und Melton, D.A. 1989a
Involvement of the *Xenopus* homeobox gene *Xhox3* in pattern formation along the anterior-posterior axis.
Cell 57:317-326

- Ruiz i Altaba, A. und Melton, D.A. 1989b
Interaction between peptide growth factors and homeobox genes in the establishment of antero-posterior polarity in frog embryos.
Nature 341:33-38
- Ruiz i Altaba, A., Choi, T. und Melton, D.A. 1991
Expression of the Xhox3 homeobox protein in *Xenopus* embryos: blocking its early function suggests the requirement of Xhox3 for normal posterior development.
Dev. Growth Differ. 33:651-669
- Ruiz i Altaba, A., 1998
Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog.
Development.125:2203-2212
- Ruiz i Altaba, A., 1999
Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease.
Development.126:3205-3216
- Ruppert, J. M., Kinzler, K. W., Wong, A. J., Bigner, S. H., Kao, F. T., Law, M. L., Seueanez, H. N., O' Brien, S. J. und Vogelstein, B. 1988.
The *GLI*-Krüppel family of human genes.
Mol. Cell. Biol. 8:3104-3113
- Ruppert, J.M., Vogelstein, B., Arheden, K.und Kinzler, K.W., 1990
GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity.
Mol Cell Biol.10:5408-5415
- Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, und Barbacid M. 1996
Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF.
Nature. 382:70-73
- Sanford LP, Kallapur S, Ormsby I, und Doetschman T. 2001
Influence of genetic background on knockout mouse phenotypes.
Methods Mol Biol. 158:217-225
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M.und Kondoh, H., 1997
A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro.
Development.124:1313-1322
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M.und Kondoh H., 1999
Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling.
Development.126:3915-3924
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, und Maas R. 2000
Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation.
Nat Genet. 24:391-395

- Saunders, J.W., Jr. und Gasseling, M.T. (1968)
Ectoderm-mesenchymal interactions in the origins of wing symmetry. In: Epithelial-Mesenchymal Interactions, R. Fleischmajer und R.E. Billingham, Herausgeber (Baltimore:Williams und Wilkins), 78-97
- Schimmang, T., Lemaistre, M., Vortkamp, A.und Ruther, U., 1992
Expression of the zinc finger gene Gli3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt).
Development.116:799-804
- Schimmang, T., van der Hoeven, F.und Ruther, U., 1993
Gli3 expression is affected in the morphogenetic mouse mutants add and Xt.
Prog Clin Biol Res.383A:153-161
- Schimmang, T., Oda, S.I.und Ruther, U., 1994
The mouse mutant Polydactyly Nagoya (Pdn) defines a novel allele of the zinc finger gene Gli3.
Mamm Genome.5:384-386
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, und Pachnis V. 1994
Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret.
Nature. 367:380-383
- Schuchardt A, D'Agati V, Pachnis V, und Costantini F. 1996
Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k- mutant mice result from defects in ureteric bud development.
Development. 122:1919-1929
- Schuffenhauer S, Leifheit HJ, Lichtner P, Peters H, Murken J, und Emmerich P. 1999
De novo deletion (14)(q11.2q13) including PAX9: clinical and molecular findings.
J Med Genet. 36:233-236
- Schwabe JW, Rodriguez-Esteban C, und Izpisua Belmonte JC. 1998
Limbs are moving: where are they going?
Trends Genet. 14:229-235
- Schweitzer, R. und Shilo, B.-Z. 1997
A thousand and one roles for the Drosophila EGF receptors.
Trends Genet. 13:191-196
- Shin, S.H., Kogerman, P., Lindstrom, E., Toftgard, R., Biesecker, L.G. 1999
GLI3 mutations in human disorders mimic Drosophila cubitus interruptus protein functions and localization.
Proc Natl Acad Sci U S A. 96:2880-2884
- Sibilia M, und Wagner EF. 1995
Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor.
Science. 269:234-238
- Simpson, E.M., Linder, C.C., Sargent, E.E., Davisson, M.T., Mobraaten, L.E. und Sharp, J.J. 1997
Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice.
Nat Genet. 16:19-27

- Sipponen, P., Simila, S., Collan, Y., Autere, T. und Herva, R. 1978
 Familial syndrome with panhypopituitarism, hypoplasia of the hypophysis, and poorly developed sella turcica.
 Arch Dis Child 53:664-667
- Slusarski, D.C., Motzny, C.K. und Holmgren, R. 1995
 Mutations that alter the timing and pattern of cubitus interruptus gene expression in *Drosophila melanogaster*.
 Genetics 139:229-240
- Smith, J.C., Price, B.M., Green, J.B., Weigel, D. und Herrmann, B. 1991
 Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction.
 Cell 67:79-87
- Southern, E. M. 1975
 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis
 Journal of Molecular Biology 98:503-517
- Stacey, A., Schnieke, A., McWhir, J., Cooper, J., Colman, A. und Melton, D.W. 1994
 Use of double-replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice.
 Mol Cell Biol. 14:1009-1016
- Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J.E., de Sauvage, F. und Rosenthal, A. 1996
 The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog.
 Nature 384:129-134
- Storm, E.E., Huynh, T.V., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kingsley, D.M. und Lee, S.J. 1994
 Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily.
 Nature 368:639-643
- Storm, E.E. und Kingsley, D.M. 1999
 GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development.
 Dev Biol. 209:11-27
- Strutt, H., Thomas, C., Nakano, Y., Stark, D., Neave, B., Taylor, A.M. und Ingham, P.W. 2001
 Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothened regulation.
 Curr Biol. 11:608-613
- Sukegawa A, Narita T, Kameda T, Saitoh K, Nohno T, Iba H, Yasugi S, und Fukuda K. 2000
 The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium.
 Development. 127:1971-1980
- Suzuki, T. und Saigo, K. 2000
 Transcriptional regulation of atonal required for *Drosophila* larval eye development by concerted action of eyes absent, sine oculis and hedgehog signaling independent of fused kinase and cubitus interruptus.
 Development 127:1531-1540

- Tada, M. und Smith, J.C. 2000
Wnt 11 is a target of *Xenopus* brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway.
Development 127:2227-2238
- Taipale, J. und Beachy, P.A. 2001
The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer.
Nature 411:349-354
- Tanaka M, Cohn MJ, Ashby P, Davey M, Martin P, und Tickle C. 2000
Distribution of polarizing activity and potential for limb formation in mouse and chick embryos and possible relationships to polydactyly.
Development. 127:4011-4021
- Tatusova, T.A. und Madden, T.L. 1999
Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences.
FEMS Microbiol Lett. 174:247-250
- te Riele, H., Maandag, E. R., und Berns, A. 1992
Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5128-5132
- Theil, T., Alvarez-Bolado, G., Walter, A. und Rüther, U. 1999a
Gli3 is required for *Emx* gene expression during dorsal telencephalon development.
Development 126:3561-3571
- Theil, T., Kaesler, S., Grotewold, L., Böse, J. und Rüther U. 1999b
Gli genes and limb development.
Cell Tissue Res. 296:75-83
- Thien, H., Büscher, D. und Rüther U. 1996
Cloning and sequence analysis of the murine Gli3 cDNA.
Biochim Biophys Acta.1307:267-269
- Thien, H. und Rüther, U. 1999
The mouse mutation *Pdn* (Polydactyly Nagoya) is caused by the integration of a retrotransposon into the Gli3 gene.
Mamm Genome 10:205-209
- Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, et al. 1995
Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype.
Science. 269:230-234
- Threadgill, D.W., Yee, D., Matin, A., Nadeau, J.H. und Magnuson, T. 1997
Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain.
Mamm Genome. 8:390-393
- Tickle C. 1981
The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing.
Nature 289:295-298

Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, und Gruss P. 1995
Pax-2 controls multiple steps of urogenital development.
Development. 121:4057-4065

Torres, R.M. und Kühn, R. 1997
Laboratory protocols for conditional gene targeting.
Oxford University Press

Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, Chuang PT, McMahon AP, und
Rosenfeld MG. 2001
Hedgehog signaling is required for pituitary gland development.
Development. 128:377-386

van der Hoeven, F., Schimmang, T., Vortkamp, A. und Ruther, U., 1993
Molecular linkage of the morphogenetic mutation add and the zinc finger gene Gli3.
Mamm Genome. 4:276-277

van Heyningen V. 1994
Genetics. One gene--four syndromes.
Nature. 367:319-320

van Deursen J, und Wieringa B. 1992
Targeting of the creatine kinase M gene in embryonic stem cells using isogenic and nonisogenic vectors.
Nucleic Acids Res. 20:3815-3820

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yoosheph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M,

Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A und Zhu, X. 2001

The sequence of the human genome.

Science 291:1304-1351

Villavicencio, E.H., Walterhouse, D.O. und Innaccone, P.M. 2000

The Sonic Hedgehog-Patched-Gli pathway in Human Development and disease.

Am. J. Hum.Genet. 67:1047-1054

Vogt TF, und Duboule D. 1999

Antagonists go out on a limb.

Cell. 99:563-566

Vortkamp, A., Gessler, M.und Grzeschik, K.H., 1991

GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families.

Nature.352:539-540

Vortkamp, A., Franz, T., Gessler, M.und Grzeschik, K.H., 1992

Deletion of GLI3 supports the homology of the human Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) and the mouse mutant extra toes (Xt).

Mamm Genome.3:461-463

Vortkamp, A., Gessler, M., Le Paslier, D., Elaswarapu, R., Smith, S.und Grzeschik, K.H., 1994

Isolation of a yeast artificial chromosome contig spanning the Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) gene region.

Genomics.22:563-568

Vortkamp, A., Gessler, M. und Grzeschik, K.-H., 1995

Identification of optimized target sequences for the Gli3 zinc finger protein.

DNA Cell Biol. 14:629-634

Wallin J, Wilting J, Koseki H, Fritsch R, Christ B, und Balling R. 1994

The role of Pax-1 in axial skeleton development.

Development. 120:1109-1121

Walterhouse, D., Ahmed, M., Slusarski, D., Kalamaras, J., Boucher, D., Holmgren, R., und Lannaccone, P. 1993

gli, a zinc finger transkription factor and oncogene, is expressed during normal mouse development.

Dev. Dyn. 196:91-102

Wang, B., Fallon, J.F.und Beachy, P.A., 2000

Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb.

Cell.100:423-434

Wang, G., Amanai, K., Wang, B. und Jiang, J. 2000

Interactions with Costal2 and suppressor of fused regulate nuclear translocation and activity of cubitus interruptus.

Genes Dev. 14:2893-2905

- Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, und Darlington GJ. 1995
Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice.
Science. 269:1108-1112
- Wang, Q.T. und Holmgren, R.A. 1999
The subcellular localization and activity of Drosophila cubitus interruptus are regulated at multiple levels.
Development 126:5097-5106
- Wang, Q.T. und Holmgren, R.A. 2000
Nuclear import of cubitus interruptus is regulated by hedgehog via a mechanism distinct from Ci stabilization and Ci activation.
Development 127:3131-3139
- Wells JM, und Melton DA. 1999
Vertebrate endoderm development.
Annu Rev Cell Dev Biol. 15:393-410
- West, J.D. 1999
Insights into Development and Genetics from Mouse Chimeras
Curr. Top Dev Biol 44:21-66
- Wild, A., Kalff-Suske, M., Vortkamp, A., Bornholdt, D., Konig, R. und Grzeschik, K.H. 1997
Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome.
Hum Mol Genet. 6:1979-1984
- Wilm B, Dahl E, Peters H, Balling R, und Imai K. 1998
Targeted disruption of Pax1 defines its null phenotype and proves haploinsufficiency.
Proc Natl Acad Sci U S A. 95:8692-8697
- Winter, R. M., und Huson, S. M. 1988
Greig Cephalopolysyndactyly Syndrome: A possible mouse homologue (Xt-Extra toes).
Am. J. Med. Gen. 31:793-798
- Wodarz, A. und Nusse, R. 1998
Mechanisms of Wnt signaling in development.
Annu. Rev.Cell Dev. Biol. 14:59-88
- Wolpert, L. 1971
Positional information and pattern formation.
Curr. Top. Dev. Biol. 6:183-224
- Wolpert L. 1989
Positional information revisited.
Development 107 Suppl:3-12
- Wright, E., Hargrave, M.R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A. und Koopman, P. 1995
The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos.
Nat Genet. 9:15-20.

Wu, H., Liu, X. und Jaenisch, R. 1994

Double replacement: Strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine *Col1a-1* gene by homologous recombination in embryonic stem cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 2819-2823

Wynshaw-Boris A. 1996

Model mice and human disease.

Nat Genet. 13:259-260

Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P.T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J.,

Niswander, L., McMahon, A. und Tickle, C. 1997

Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb.

Development 124:4393-4404

Yang, Y., Guillot, P., Boyd, Y., Lyon, M.F. und McMahon, A.P., 1998

Evidence that preaxial polydactyly in the Doublefoot mutant is due to ectopic Indian Hedgehog signaling.

Development. 125:3123-3132

Yoon, J.W., Liu, C.Z., Yang, J.T., Swart, R., Iannaccone, P. und Walterhouse, D. 1998

GLI activates transcription through a herpes simplex viral protein 16-like activation domain.

J Biol Chem. 273:3496-3501

Zarkower, D. und Hodgkin, J., 1992

Molecular analysis of the *C. elegans* sex-determining gene *tra-1*: a gene encoding two zinc finger proteins.

Cell. 70:237-249

Zeng, X., Goetz, J.A., Suber, L.M., Scott, W.J. Jr, Schreiner, C.M. und Robbins, D.J. 2001

A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling.

Nature 411:716-720

Zuniga A, Haramis AP, McMahon AP, und Zeller R. 1999

Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds.

Nature. 401:598-602