# Die molekulare Ursache des Pallister-Hall-Syndroms

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Patrick Hill

aus Mönchengladbach

Oktober 2007

Aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent:Univ.-Prof. Dr. U. RütherKoreferent:Univ.-Prof. Dr. R. WagnerTag der mündlichen Prüfung: 20.11.2007

# **Inhaltsverzeichnis**

1. EINLEITUNG	6
1.1 Der Hedgehog-Signalweg	6
1.1.1 Die hedgehog-Signaltransduktionskaskade in Drosophila	7
1.1.2 Die Hedgehog-Signaltransduktionskaskade in Vertebraten	
1.1.2.1 Duplikationen von Signalwegskomponenten	
1.1.2.2 Die Familie der GLI-Transkriptionsfaktoren	9
1.1.2.3 Weitere Besonderheiten des HH-Signalwegs von Vertebraten	
1.2 DER SHH-SIGNALWEG IN DER ANTEROPOSTERIOREN MUSTERBILDUNG DER DIS	STALEN
GLIEDMABE	15
1.2.1 Die Gliedmaßenknospe als entwicklungsbiologisches Modellsystem	
1.2.2 Die Zone polarisierender Aktivität	
1.2.3 Die Funktion von SHH in der Gliedmaßenentwicklung	
1.2.4 Die GLI-Familie in der Entwicklung der distalen Gliedmaße	
1.2.5 Die anteroposteriore Musterbildung unter Kontrolle eines SHH-regulierten GL	I3-Isoform-
Gradienten	
1.3 DIE KLINISCHE RELEVANZ DES HEDGEHOG-SIGNALWEGS	24
1.3.1 Durch Störungen des Hedgehog-Signalwegs hervorgerufene Krankheiten	
1.3.2 GLI3-assoziierte Störungen der Embryonalentwicklung	
1.3.2.1 Präaxiale Polydaktylie Typ IV (PPD IV)	
1.3.2.2 Postaxiale Polydaktylie Typ A und A/B (PAP-A; PAP-A/B)	
1.3.2.3 Acrocallosal-Syndrom	
1.3.2.4 Greig Zephalopolysyndaktylie-Syndrom (Greig-Syndrom, GCPS)	
1.3.2.5 Pallister-Hall-Syndrom (PHS)	
1.4 Die <i>Gli3<sup>4699</sup>-</i> Mausmutante	
1.5 Ziel dieser Arbeit	
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 TIERHALTUNG	
2.2 Isolierung definierter Embryonalstadien	
2.3 Identifizierung genetisch veränderter Tiere mittels Polymerase-	
KETTENREAKTION (PCR)	
2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Geweben	
2.3.1.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien	
2.3.1.2 DNA-Isolierung aus embryonalem Gewebe	
2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	

	2.3.2.1 Sequenzen der genutzten Oligonukleotide (Primer)	37
	2.3.2.2 Verwendung der Primerpaare	37
	2.3.2.3 PCR-Amplifikation	37
	2.3.2.4 PCR-Programme	38
	2.4 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN	39
	2.5 WHOLE MOUNT IN SITU HYBRIDISIERUNG	40
	2.5.1 Vorbehandlung und Hybridisierung	40
	2.5.2 Entfernung unspezifisch gebundener RNA-Sonde und Antikörperinkubation	41
	2.5.3 Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper und Färbungsreaktion	41
	2.6 RNA-Sondensynthese	42
	2.6.1 Sequenzspezifische enzymatische Spaltung zur Plasmidlinearisierung	42
	2.6.2 Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung	43
	2.6.3 Synthese von Antisense-RNA-Sonden	43
	2.7 TRANSFORMATION VON PLASMIDEN IN ESCHERICHIA COLI	44
	2.8 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	45
	2.9 KNOCHEN-KNORPEL-FÄRBUNG	45
	2.10 FOTODOKUMENTATION	46
3.	ERGEBNISSE	47
	3.1 Anzahl und Identität der Zehen sind bei <i>Gli3<sup>4699</sup></i> -Embryonen verändert	47
	$3.2 \ Der \ Einfluß \ unterschiedlicher \ GLI3-Konzentration \ auf \ die \ verschiedenen$	
	ASPEKTE DER ENTWICKLUNG DER DISTALEN GLIEDMAßE	49
	3.3 Die Etablierung der ZPA und die Aktivität der AER sind in den mutanten	
	GLIEDMAßENKNOSPEN NICHT BEEINTRÄCHTIGT	53
	3.4 ANALYSE DER ANTEROPOSTERIOR SPEZIFISCHEN GENEXPRESSION	55
	3.5 ANALYSE DER MOLEKULAREN ZEHENIDENTITÄTEN	58
	3.6 DIE ZEHENENTWICKLUNG VON GLI3 <sup>2699</sup> -MUTANTEN IN ABWESENHEIT VON SHH	60
4.	DISKUSSION	66
	4.1 QUANTITATIVE ASPEKTE DER AKTIVITÄT VON GLI3 BZW. GLI3 <sup>2699</sup>	66
	4.1.1 Die Regulation der Zehenzahl	66
	4.1.2 Die Ausbildung der A/P-Achse	67
	4.1.3 Isoformspezifische Beiträge zur A/P-Musterbildung	69
	4.1.4 Anteroposteriore Asymmetrie jenseits von SHH- und GLI3-Einflüssen	72
	4.2 Die $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante als Tiermodell des Pallister-Hall-Syndroms	74

4.2.2 Der polydaktyle Phänotyp	77
4.2.2.1 Evolutionäre Konservierung der GLI3-Funktion	77
4.2.2.2 Stellt GLI3 <sup>2699</sup> einen vollwertigen Vertreter des wildtypischen GLI3R dar?	79
4.2.2.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von GLI3 <sup>6699</sup> und GLI3R	80
4.2.3 Neue Erkenntnisse zur molekularen Grundlage des Pallister-Hall-Syndroms	81
4.3 Die $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante als Modellsystem zur detaillierteren Analyse der	
GLI3R-FUNKTION	83
5. ZUSAMMENFASSUNG	87
6. ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN	88
7. LITERATUR	90
8. DANKSAGUNG	107
9. ERKLÄRUNG	108

## **1. Einleitung**

#### **1.1 Der Hedgehog-Signalweg**

Die zentrale Frage der Entwicklungsbiologie lautet: Welche Mechanismen realisieren die Differenzierung in verschiedene Zelltypen und wie werden diese wiederum in einer Weise organisiert, die einem exakten arttypischen Bauplan folgen muss. Eine gängige These ist, dass Zellen einem Schicksal folgen, das auf den Positionsinformationen beruht, die sie aus ihrem Umfeld erhalten. Oftmals werden diese Positionsinformationen von evolutionär konservierten Familien sekretierter Signalmoleküle, sog. Morphogene, geliefert. Der von der Familie der Hedgehog-Proteine kontrollierte Signalweg hat sich als einer der Bedeutendsten in der embryonalen Entwicklung herausgestellt (Ingham und McMahon, 2001; McMahon et al., 2003). Auch postnatal kommen ihm wichtige Rollen zu, so z.B. innerhalb des Immunsystems oder auch in der Gewebehomöostase, d.h. in der Kontrolle der Zellproliferation innerhalb ausgewachsener Organe (Benson et al., 2004; Karhadkar et al., 2004; Ito et al., 1999). Während letzteres im gesunden Organismus der Heilung und Reparatur nach Gewebeverletzungen dient, können Mutationen, die essentielle Komponenten des Signalwegs in ihrer Funktion beeinträchtigen, dass irreguläre Wachstum von Gewebe begünstigen und so die Entstehung verschiedener Krebsarten fördern (Pasca di Magliano und Hebrok, 2003; Kasper et al., 2006). Deshalb hat dieser Signalweg nicht nur das Interesse der Entwicklungsbiologie, sondern in zunehmendem Maße auch das der klinischen und medizinischen Forschung auf sich gezogen (Sanchez et al., 2005; Romer und Curran, 2005; Feldmann et al., 2007).

*Hedgehog* wurde zuerst von Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus bei der Suche nach Segmentspolaritätsgenen in der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Bald nach dieser Entdeckung wurden homologe Gene auch in Vertebraten beschrieben (Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993; Riddle et al., 1995; Roelink et al., 1994). Die weitere Aufklärung des dazugehörigen Signalwegs und die Identifizierung der beteiligten Faktoren wurde allerdings weiterhin vor allem durch die Forschung am Modellorganismus *Drosophila* vorangetrieben. Deswegen bestehen über den Hedgehog-Signalweg der Fliege die wohl detailliertesten Kenntnisse. Aus diesem Grund werden im Folgenden zunächst die in der Fliege gewonnenen Einblicke genutzt, um in das Gesamtbild des Signalwegs einzuführen. Die sich daran anschließende Schilderung der teilweise abweichenden Abläufe in Vertebraten bzw. im Säugetier wird deutlich machen, dass

6

trotz der Bedeutung der Fliege als Untersuchungsobjekt eine große Notwendigkeit besteht, die Forschung an solchen Modellorganismen zu verstärken, die, wie die Maus, eine wesentlich engere evolutionäre Verwandtschaft mit dem Menschen aufweisen.

#### 1.1.1 Die hedgehog-Signaltransduktionskaskade in Drosophila

Bei dem Molekül hedgehog (hh) handelt es sich um ein sekretiertes Protein, dass mehreren postranslationalen Modifikationen unterworfen ist. Zunächst kommt es zu einer autokatalytischen Proteolyse des C-Terminus. Das resultierende N-hh erfährt außerdem zwei Lipidmodifikation in Form kovalenter Bindungen von Cholesterin am C-Terminus und Palmitinsäure am N-Terminus, bevor das nun reife N-hh unter Beteiligung des Membranproteins dispatched die Ursprungszelle verlässt (Ingham, 2001; Nusse et al., 2003; Mann et al., 2004). Hh ist der Ligand für den evolutionär hochkonservierten Rezeptor patched (ptc). Ptc, ein Membranprotein mit 12 Transmembrandomänen, ist ein negativer Regulator der hh-Signaltransduktion, da es, im Unterschied zu den Rezeptoren der meisten anderen Signalwege, den Signalweg bei Abwesenheit des Liganden ,aktiv' unterdrückt. Dies geschieht auf noch ungeklärte Art und Weise durch Inhibierung von smoothened (smo). Smo, ebenfalls ein Transmembran-Protein, ist ein essentieller positiver Vermittler des hh-Signals (van den Heuvel und Ingham, 1996). Unterhalb von smo im Signalweg befindet sich der im Zytoplasma lokalisierte sog. ,hedgehog-Signalkomplex' (HSC), der sich aus 3-4 Proteinen zusammensetzt: dem Kinesin-ähnlichen costal 2 (cos2), der Serin/Threonin-Kinase fused (fu), dem Transkriptionsfaktor cubitus interruptus (ci) und in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus des Signalwegs auch suppressor of fused (sufu). Durch die Bindung an sufu und cos2 wird der Kerneintritt des Transkriptionsfaktors ci verhindert. Darüber hinaus bindet cos2 drei Kinasen: Protein Kinase A (PKA), Glycogen Synthase Kinase 3ß (GSK3ß) und Casein Kinase 1 (CK1). In Abwesenheit eines hh-Signals phosphorylieren diese die 155 kD Voll-Längen-Isoform von ci (ci-155) und setzen dadurch eine Prozessierung in Gang, die zu einer Proteasomabhängigen Degradierung des C-Terminus von ci führt, an deren Ende ein C-terminal verkürztes und nunmehr als ci-75 bezeichnetes Molekül steht (Chen et al., 1998A; Price et al., 1999; Price et al., 2002). In Folge dessen kann ci-75 aus dem Zytoplasma in den Kern vordringen, um dort die Expression von hh-Zielgenen zu reprimieren (Zhang et al., 2005). Sobald jedoch der extrazelluläre Ligand hh an ptc bindet, wird die Inhibierung von smo aufgehoben und es kommt zu einer Assoziierung von smo und cos2 (Lum et al., 2003; Jia et al., 2003). Die drei Kinasen (PKA, CK1, GSK3) lösen sich daraufhin aus dem HSC, wodurch die Phosphorylierung und damit die Prozessierung von ci-155 gestoppt werden. Die Voll-Längen-Isoform ci-155 wird nicht weiter durch Bindung an cos2 und sufu im Zytoplasma zurückgehalten und kann somit in den Kern eindringen und dort als transkriptioneller Aktivator von hh-Zielgenen wirken (Ohlmeyer und Kalderon, 1998). Ci stellt also einen bifunktionalen Transkriptionsfaktor dar, der, je nach Prozessierungsstatus, entweder fördernd oder hemmend auf die Transkription wirken kann. Neuere Erkenntnisse sprechen außerdem dafür, dass der hedgehog-Signalweg sogar mindestens drei Aktivierungsstufen annehmen kann, die wahrscheinlich mit der Dauer und der Konzentration des hh-Signals in Zusammenhang stehen (Lum et al., 2003; Jia et al., 2003). Die Unterdrückung der Zielgenexpression kann dabei durch die Anwesenheit von hh in zwei Stufen aufgehoben werden. Geringe Mengen des Liganden unterbinden zunächst die Produktion des Repressors ci-75, was für die Expression einiger Gene wie *decapentaplegic* bereits ausreichend ist. Die Expression anderer Gene, wie ptc oder engrailed, benötigt die nukleäre Translokation von ci-155, was erst bei dauerhafter oder starker Stimulation des hh-Signalwegs gewährleistet ist (Übersicht in Jia und Jiang, 2006). Der Identifizierung der Komponenten des hh-Signalwegs in Drosophila folgte bald auch die Beschreibung homologer Gene in Vertebraten (Übersicht in Jia und Jiang, 2006).

#### 1.1.2 Die Hedgehog-Signaltransduktionskaskade in Vertebraten

Die Identifizierung vieler Vertebraten-Homologe von Komponenten der *Drosophila*-hh-Signalkaskade ließ zunächst die Erwartung entstehen, dass dieser Signalweg in der Evolution weitgehend unverändert Bestand gehabt hätte (McMahon et al., 2003). Neue Erkenntnisse sprechen allerdings dafür, dass sich der Signalweg der Vertebraten und besonders der der Säugetiere (*Mammalia*) in bestimmten Bereichen deutlich von dem der Fliege unterscheidet (Oro, 2006; Østerlund und Kogerman, 2006; Huangfu und Anderson, 2006).

#### 1.1.2.1 Duplikationen von Signalwegskomponenten

Die offensichtlichsten Unterschiede zwischen dem Hedgehog-Signalweg der Invertebraten und dem der Vertebraten bestehen zunächst darin, dass einige beteiligte Gene im Verlauf der Evolution eine Duplikation erfahren haben. So sind für *Mammalia* zwei *Ptc*-Gene (*Ptc1*, *Ptc2*) und drei *Hh*-Gene (*Indian*, *Desert* und *Sonic Hedgehog*) beschrieben worden. Von den beiden Rezeptoren wird vor allem PTC1 eine Bedeutung in der Embryonalentwicklung zugeschrieben (Milenkovic et al., 1999; Rahnama et al., 2004; Goodrich et al., 1997). Auch unter den drei Hedgehog (HH)-Proteinen ist die Bedeutung innerhalb der Embryonalentwicklung sehr ungleich verteilt. So ist Indian hedgehog vornehmlich für die Knochenmorphogenese von Bedeutung (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996; St-Jacques et al., 1999). Für Desert hedgehog ist lediglich eine Beteiligung an der Entwicklung der Hoden beschrieben worden (Bitgood et al., 1996; Yao et al., 2002). Da PTC2 vorwiegend in Spermatozyten exprimiert wird, stellt es dort vermutlich den Rezeptor für DHH dar (Murone et al., 1999). Sonic hedgehog (SHH) ist hingegen an einer enormen Vielzahl von entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt und ist deshalb sicher das Bedeutendste und auch das am intensivsten Untersuchte der Hedgehog-Proteine (Ingham und McMahon, 2001). Auch die Funktion des Transkriptionsfaktors, die in der Fliege allein durch ci ausgefüllt wird, wird im Hedgehog-Signalweg der Vertebraten von einer Protein-Familie mit drei Mitgliedern, GLI1-3, ausgefüllt, bei denen es sich um Homologe von ci handelt (Ruppert et al., 1988).

#### 1.1.2.2 Die Familie der GLI-Transkriptionsfaktoren

Als erstes Mitglied der Familie wurde das *GLI1*-Gen (früher: *GLI*) aus Zellen menschlicher Hirntumoren, sogenannten Glioblastoma, kloniert, wovon sich auch der Name der Genfamilie ableitet (Kinzler et al., 1987). Auf Basis von Sequenzähnlichkeiten zu *GLI1* wurden dann auch die beiden anderen Mitglieder, *GLI2* und *GLI3*, identifiziert (Ruppert et al., 1988). Alle drei GLI-Proteine enthalten eine hoch konservierte, DNA-bindende Domäne, die aus fünf Wiederholungen eines Zinkfinger-Motivs vom  $C_2H_2$ -Typ besteht (Ruppert et al., 1988). Zinkfinger sind DNA-bindende Strukturen, die, im Falle des  $C_2H_2$ -Typs, durch ein zentrales Zn<sup>2+</sup>-Ion gebildet werden, das von zwei Cystein- und zwei Histidinresten gebunden wird. Die drei GLI-Faktoren binden an eine identische, neun Basenpaare lange DNA-Sequenz (GACCACCCA), über die Zielgene reguliert werden können (Kinzler und Vogelstein, 1990; Paveletich und Pabo, 1993). Abgesehen von der Zinkfingerdomäne weisen die GLI-Proteine untereinander noch 6 weitere Regionen hoher Sequenzkonservierung auf (Abb. 1; Ruppert et al., 1990). Beträchtliche Konservierung auf Aminosäureebene innerhalb dieser Regionen besteht auch zwischen den homologen Genprodukten von Mensch und Maus (Ruppert et al., 1988; Hughes et al., 1997).

Anders als das ci-Protein in der Fliege unterliegt GLI1 offenbar keiner posttranslationalen Prozessierung, sondern dient nur als ein Aktivator von HH-Zielgenen (Marigo et al., 1996; Hynes et al., 1997; Lee et al., 1997; Sasaki et al., 1999). Dabei ist *Gli1* selbst ein HH-Zielgen und wirkt somit als positiver Rückkopplungsmechanismus, um die Aktivität des HH-Signalwegs zu verstärken (Lee et al., 1997; Marigo et al., 1996). Eine Notwendigkeit für GLI1 in der embryonalen Entwicklung von Säugetieren besteht jedoch offenbar nicht, da Mäuse, die kein funktionelles GLI1 besitzen, keine erkennbaren phänotypischen Veränderungen aufweisen (Park et al., 2000; Bai et al., 2002). Genetische und biochemische Analysen sprechen stattdessen dafür, dass GLI2 und GLI3 die primären Mediatoren von HH-Signalen sind (Ding et al., 1998; Dai et al., 1999; Bai et al., 2002). Wie im ci-Protein von Drosophila sind auch in GLI2 und GLI3 Phosphorylierungsstellen für PKA, GSK3ß und CK1 vorhanden (Sasaki et al., 1999, Wang et al., 2000; Price und Kalderon, 2002; Pan et al., 2006). Ebenfalls analog zu der unter der Kontrolle von hedgehog stehenden Prozessierung von ci-155 zur Repressorform ci-75 können sowohl GLI2 als auch GLI3 durch Degradation des C-Terminus zu einer kurzen Isoform prozessiert werden, wobei diese Prozessierung in beiden Fällen durch SHH inhibiert wird (Wang et al., 2000; Pan et al., 2006; Wang und Li, 2006). Obwohl für beide Proteine, GLI2 und GLI3, jeweils sowohl aktivierende als auch reprimierende Wirkungen auf die Transkription von SHH-Zielgenen berichtet wurden, gibt es dennoch starke Hinweise darauf, dass GLI2 vornehmlich als Aktivator wirkt, während GLI3 hauptsächlich die Repressorfunktion zukommt (Buttitta et al., 2003; Motoyama et al., 2003; Bai et al., 2004; Lei et al., 2004; McDermott et al., 2005).

Für eine eher aktivierende Funktion von GLI2 spricht zum einen, dass die Prozessierung von GLI2 (185 kD) zur kurzen, potentiell als Repressor fungierenden Isoform (78 kD) sehr ineffektiv ist (Pan et al., 2006). Außerdem führt der Ausfall von GLI2 in Mäusen zu perinataler Letalität, die mit multiplen Störungen in der Entwicklung des Zentralen Nervensystems, der Wirbel, der Lunge und der Knochen einhergeht, deren Ausprägung auf eine geringe Aktivität des Hedgehog-Signalwegs hindeutet (Ding et al., 1998; Matise et al., 1998). Desweiteren ist die Expression von *Gli1* und *Ptc1*, deren Expression als direktes Erkennungsmerkmal für Hedgehog-Signalaktivität gilt, in *Gli2<sup>-/-</sup>*-Mutanten stark verringert (Ding et al., 1998; Matise et al., 1998). Deutliche Unterstützung für die These, dass GLI2 vor allem eine aktivierende Funktion ausübt, ergab sich zudem aus einer weiteren Studie: Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von GLI2 kompensiert wurde, wenn anstelle von GLI2 das nur als Aktivator fungierende GLI1 vom *Gli2*-Locus exprimiert wurde (Bai und Joyner, 2001).

Im Gegensatz zu den Konsequenzen eines GLI1- oder GLI2-Ausfalls führt der Verlust von GLI3 in Mäusen und Menschen zu Phänotypen, die für eine Überaktivität des Hedgehog-Signalwegs und damit für einen Verlust einer essentiellen Repressorfunktion sprechen (Vortkamp et al., 1991; Schimmang et al., 1992; Hui und Joyner, 1993). In Abwesenheit von SHH-Signalen wird das GLI3-Protein (GLI3-FL; 190 kD) effektiv zu einer kurzen Isoform (83 kD) umgesetzt, die in Zellkulturexperimenten potente Repressoraktivität zeigt und aufgrund dieser Wirkung auch als GLI3-Repressor (GLI3R) bezeichnet wird (Wang et al., 2000; Litingtung et al., 2002; Pan et al., 2006). In vivo Analysen solcher Genexpression, die als Marker für Hedgehog-Aktivität gilt, hat die Funktion von GLI3 als essentiellem transkriptionellem Repressor weiter unterstrichen (Litingtung und Chiang, 2000; Aoto et al., 2002; Litingtung et al., 2002; Rallu et al., 2002; te Welscher et al., 2002A/B).

Bemerkenswerterweise werden die drastischen Konsequenzen eines SHH-Ausfalls deutlich gemindert, wenn gleichzeitig auch ein Ausfall oder eine quantitative Reduzierung von GLI3 vorliegt (Litingtung und Chiang, 2000; Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002B). Das macht deutlich, dass sich ein Großteil der mit dem Ausfall von SHH verbundenen Fehlbildungen auf ein Übermaß von GLI3-Repressoraktivität zurückführen lässt, die offenbar das Resultat der ohne SHH unkontrolliert ablaufenden Prozessierung von GLI3-FL zu GLI3R ist.



Abb.1 Schematische Darstellung des GLI3-Proteins. Die grün-blauen Rechtecke #1-7 kennzeichnen die Regionen von GLI3, in denen große Sequenzähnlichkeit zwischen den drei GLI-Proteinen besteht; die Position der für die DNA-Bindung entscheidenden Zinkfinger-Domäne ist mit einem blauen Rechteck skizziert (Ruppert et al., 1988; Ruppert et al., 1990). Der Bereich der GLI3-Prozessierung und damit der C-Terminus der GLI3-Repressorform liegt etwa zwischen 700-740 AS in Region #3; die für die Prozessierung wichtigen PKA-Phosphorylierungsstellen erstrecken sich über die Regionen #4 und #5 (AS 844-943). Das GLI3-Protein der Maus (murin) ist 1596 AS groß, das des Menschen mit 1580 AS nur unwesentlich kleiner.

#### 1.1.2.3 Weitere Besonderheiten des HH-Signalwegs von Vertebraten

Neben den schon länger bekannten Duplikationen einiger im SHH-Pathway involvierter Gene haben kürzlich erschienene Studien darüber hinaus festgestellt, dass sich die Signalweiterleitung von Smo zu den GLI-Proteinen in Vertebraten in einigen Punkten stark von den in der Fliege genutzten Strategien unterscheidet. Zwar ist sowohl Drosophila als auch Maus gemeinsam, dass ein einzelnes Smo-Gen für alle Antworten auf HH-Liganden verantwortlich ist (Alcedo et al., 1996; van den Heuvel and Ingham, 1996; Zhang et al., 2001), dennoch weist bereits das smo/SMO-Protein selbst große Varianz zwischen den Spezies auf. Obwohl mehrere Studien gezeigt haben, dass die zytoplasmatische C-terminale Domäne (CTD) des Drosophila-smo von entscheidender Bedeutung für die Signalweiterleitung ist, ist dieser Bereich im SMO-Protein der Vertebraten nur gering konserviert (Huangfu und Anderson, 2006). Dazu passt, dass auch die Regulierung der Aktivität von smo/SMO in Drosophila und Vertebraten voneinander abweicht. Dies betrifft vor allem die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne und die damit in Zusammenhang stehende Lokalisierung des smo/SMO-Proteins (Huangfu und Anderson, 2006). In der Fliege führt die Bindung von hh an ptc zu einer Phosphorylierung von smo durch zwei der auch an anderer Stelle des Signalwegs aktiven Kinasen PKA und CK1; in Folge dessen tritt eine Akkumulation von smo an der Zelloberfläche ein (Jia et al., 2004; Denef et al., 2000; Nakano et al., 2004; Zhu et al., 2003). Experimente an Säugerzellen zeigten aber, dass dort eine andere Kinase, die G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 2, SMO in Anwesenheit von HH-Signalen phosphoryliert (Chen et al., 2004; Meloni et al., 2006). Im Unterschied zu der Situation in der Fliege führt die HH-induzierte Phosphorylierung außerdem nicht zu einer Akkumulation von SMO an der Zelloberfläche, sondern leitet im Gegenteil die Internalization von SMO ein (Incardona et al., 2002; Chen et al., 2004; Meloni et al., 2006).

Neben ihrer Bedeutung für die Lokalisation von smo stellten mehrere Veröffentlichungen die funktionelle Relevanz der C-terminalen intrazellulären Domäne von *Drosophila*-smo heraus, indem sie zeigten, dass in Anwesenheit von hh-Signalen smo über seine CTD mit cos2 assoziiert und dadurch die Membranereignisse mit dem zytoplasmatischen Komplex verbunden werden (Lum, et al., 2003; Ogden et al., 2003; Ruel et al., 2003; Jia et al., 2003). Cos2 besetzt in *Drosophila* eine Schlüsselstelle innerhalb des hh-Signalwegs, indem es die physische Verbindung zwischen dem Transkriptionsfaktor ci und den für die Einleitung der Prozessierung benötigten drei Kinasen darstellt (Zhang et al., 2005). Desweiteren scheint cos2 sowohl an der positiven wie an der negativen Signalvermittlung in der Fliege beteiligt zu sein,

da es durch die Assoziierung mit der Kinase fu zusätzlich eine Rolle in der Stimulierung der Aktivator-Isoform spielt (Kalderon, 2004). Sowohl Cos2 als auch Fu stellen essentielle Komponenten des hh-Signalwegs in der Fliege dar (Grau und Simpson, 1987; Sánchez-Herrero et al., 1996; Sisson et al., 1997). Im starken Gegensatz dazu sind weder in Mauszellen bei Verlust von Cos2-Orthologen (Kif7 und Kif27) noch bei Ausfall von FU in  $Fu^{-/-}$ -Mausembryonen Auswirkungen auf den HH-Signalweg zu beobachten (Chen et al., 2005; Varjosalo et al., 2006).

Andererseits scheint das Protein Supressor of Fused (SUFU) in Säugetieren eine wesentlich bedeutendere Rolle als in der Fliege einzunehmen. SUFU ist für die Lebens- und Fortpflanzungsfähigkeit der Fliege nicht erforderlich (Preat, 1992). Es wurde deshalb untypischerweise nicht aufgrund eines eigenen mutanten Phänotyps identifiziert, sondern dadurch, dass *SuFu*-Mutationen einen Teil der durch *Fu*-Mutationen hervorgerufenen Defekte unterdrückten (Preat, 1992; Preat et al., 1993). Hingegen scheint SUFU in der embryonalen Entwicklung von Säugetieren eine essentielle Repressorfunktion auszuüben, denn *SuFu*<sup>-/-</sup>-Mausembryonen zeigen Symptome einer massiven Hochregulierung des HH-Signalwegs (Svärd et al., 2006). Der Phänotyp der *SuFu*<sup>-/-</sup>-Embryonen ähnelt dabei denen von *Ptc*<sup>-/-</sup>-Mutanten und wie diese sterben auch *SuFu*<sup>-/-</sup>-Embryonen bereits an Tag 9.5 der Embryonalentwicklung (Svärd et al., 2006; Goodrich et al., 1997).

Eine weitere Besonderheit des HH-Signalwegs der Säugetiere besteht in der Beteiligung von primären Zilien. Bei primären Zilien handelt es sich um hochspezialisierte Zellmembranausstülpungen. An ihrer Basis werden sie durch einen als Basalkörper bezeichneten Proteinkomplex vom Zytoplasma der Zelle abgegrenzt, weswegen man sie mittlerweile als eigenständige Kompartimente betrachtet (Michaud und Yoder, 2006). Eine Verbindung zwischen primären Zilien und dem HH-Signalweg ergab sich durch die Identifizierung von Genen, die für Komponenten der primären Zilie kodierten und deren Ausfall überraschenderweise Fehlbildungen in Mausembryonen hervorrief, die große Ähnlichkeiten mit denen von Shh-defizitären Mutanten hatten (Vierkotten et al., 2007; Übersicht in Huangfu und Anderson, 2006). Die in Folge dieser Beobachtungen durchgeführten Untersuchungen zeigten dann auch, dass die Mutationen dieser Zilienassoziierten Genen zu einer veränderten Balance von GLI-Aktivator und Repressor-Molekülen führten, was Parallelen zu der Situation in cos2 Drosophila-Mutanten aufwies (Übersicht in Huangfu und Anderson, 2006; Vierkotten et al., 2007). Mittlerweile wird deshalb diskutiert, ob die in der Fliege von cos2 ausgefüllte Funktion in Säugetieren möglicherweise von der Zilie übernommen wird (Oro, 2006). Diese These stützt sich auch

13

darauf, dass in Säugetieren die Komponenten des Signalwegs, wie PTC1, SMO, SUFU und die GLI-Proteine, in Zilien konzentriert vorliegen (Haycraft et al., 2005; Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007). Dadurch wird wohlmöglich die erforderliche räumliche Nähe gewährleistet, die in *Drosophila* durch Interaktion der homologen Signalwegskomponenten mit cos2 besteht.

Es bleibt zusammenfassend also festzuhalten, dass das Grundgerüst des Hedgehog-Signalwegs im Prinzip während der Evolution zwar weitgehend erhalten geblieben ist: Sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten bindet ein Hedgehog-Ligand an einen Patched-Rezeptor, wodurch Smo das Verhältnis der GLI/ci-Isoformen vom Status der Reprimierung auf den der Aktivierung kippen kann (Überblick für Vertebraten in Abb. 1). Die geschilderten Abweichungen in den Prozessen des Hh-Signalwegs zwischen *Drosophila* und Vertebraten machen jedoch andererseits deutlich, dass ein großer Bedarf besteht, die Forschung an geeigneten Tiermodellen zu intensivieren. Vor allem hinsichtlich eines möglichen medizinischen Nutzens der so gewonnenen Erkenntnisse für die Behandlung der Vielzahl von Krankheiten, die eine Beteiligung des HH-Signalwegs aufweisen, ist dies sicher unabdingbar. Nur als ein Beispiel sei in diesem Zusammenhang die therapeutisch höchst interessante Substanz Cyclopamin genannt (Keeler, 1978). Sie wirkt als ein Inhibitor des SMO-Proteins der Vertebraten und kann so zur Reprimierung des HH-Signalwegs genutzt



und damit möglicherweise auch zur Therapie von bestimmten Krebsarten eingesetzt werden (Athar et al., 2004; Sanchez et al., 2005). Bei Forschungen an der Fliege allein wäre diese vielversprechende Substanz wohl nie entdeckt worden, da Cyclopamin inaktiv gegen das *Drosophila*-Smo ist (Lum und Beachy, 2004).

**Abb.2 Das Grundgerüst des SHH-Signalwegs.** Durch Bindung von SHH an PTC1, wird die Inhibierung von SMO aufgehoben, wodurch die Produktion von GLI-Repressorformen reprimiert wird und die stabilisierten GLI-Aktivatorformen die Expression von SHH-Zielgenen aktivieren können (modifiziert nach Riobo und Manning, 2007).

# 1.2 Der SHH-Signalweg in der anteroposterioren Musterbildung der distalen Gliedmaße

#### 1.2.1 Die Gliedmaßenknospe als entwicklungsbiologisches Modellsystem

Die Gliedmaße dient bereits seit langem als Studienobjekt in der Entwicklungsbiologie. In den Anfängen der Entwicklungsbiologie, die manche schon in den Arbeiten von Aristoteles sehen, sprachen dafür in erster Linie experimentelle Gründe. Da sich die Gliedmaßen außen am Körper befinden, ist ihre Entwicklung, z.B. in angebohrten Hühnereiern, gut zu verfolgen. Des weiteren ermöglicht diese exponierte Lage die vergleichsweise einfache Durchführung experimenteller chirurgischer Eingriffe in die Gliedmaßenentwicklung. Das Protokollieren der Effekte solcher Manipulationen ist selbstverständlich aber nur dann möglich, wenn die Entwicklung des Embryos nach dem Eingriff weiter voranschreitet, der Embryo an den hervorgerufenen Veränderungen also nicht stirbt. Somit war eine traditionell entscheidende Größe für die Wahl der Gliedmaße als Untersuchungsobjekt, dass isolierte Veränderungen in diesem System die Lebensfähigkeit des Embryos insgesamt nicht beeinträchtigen.

Ein weiterer entscheidender Punkt, der das Studium der Gliedmaßenentwicklung für die gesamte Entwicklungsbiologie bis heute so bedeutend macht, offenbarte sich erst mit zunehmendem Wissen über entwicklungsbiologische Vorgänge insgesamt. Es zeigte sich, dass sich die grundlegenden Mechanismen der Entwicklung in den verschiedenen Organen sehr stark ähneln. Die Logik hinter dieser mehrfachen Verwendung der gleichen Mechanismen erschließt sich, wenn man bedenkt, dass zu Beginn der Entstehung jedes Organs immer dasselbe Problem besteht. Um aus einer anfänglich weitgehend unstrukturierten Gruppe von Zellen ein hochkomplexes Organ hervorzubringen, das eine genau definierte Architektur besitzt, muss der Zellpopulation zunächst eine (räumliche) Ordnung vermittelt werden, so dass jede Zelle ihre relative Position innerhalb des Organs "kennt" und sich entsprechend entwickeln kann (Wolpert, 1969). Die dafür notwendige Vermittlung von Positionsinformationen, die man auch als Musterbildung bezeichnet, betrifft die Entwicklung der Gliedmaße genau wie die jedes anderen Organs. Deshalb geben Erkenntnisse, die durch das Studium der Gliedmaßenentwicklung gewonnen wurden, auch einen wertvollen Einblick in die grundsätzlichen Vorgänge der frühen Entwicklung anderer Organe, bei denen sich aufgrund ihrer anatomischen Lage oder ihrer Notwendigkeit für das unmittelbare Überleben des Embryos das direkte Studium ihrer Entwicklung problematischer darstellt.

Das erste von außen erkennbare Zeichen der beginnenden Gliedmaßenentwicklung ist eine Ausbeulung an der Flanke des Embryos. Diese Ausbeulung besteht aus lose gepackten mesenchymalen Zellen, die von einer ektodermalen Hülle umschlossen werden. Innerhalb kurzer Zeit muss sich diese scheinbar chaotische Masse von mesenchymalen Zellen nach einem vorgegebenen, präzisen Bauplan zu Knochen, Muskeln, Sehnen und Bindegewebe organisieren, um eine voll funktionsfähige Extremität hervorzubringen.

Die Tragweite dieses Vorgangs wird deutlich, wenn man z.B. den scheinbar so vertrauten Anblick einer menschlichen Hand unter den Aspekten der Entwicklungsbiologie, d.h. unter dem Gesichtspunkt der Notwendigkeit von Musterbildung, betrachtet. Es bestehen deutlich erkennbare Unterschiede zwischen Handober- und Unterseite, die Fingernägel bilden sich immer am äußersten Glied der Finger, der Daumen entsteht ebenfalls nur an einer genau definierten Position und ist auch anhand seiner Morphologie kaum mit den anderen Fingern zu verwechseln. Offenbar weist also die Anatomie der Hand, die als distalster Teil der Extremität auch als Autopod bezeichnet wird, eine sehr vielschichtige Zusammensetzung entlang der drei Raumdimensionen auf. In anatomischen Beschreibungen werden diese drei ,dorsoventral' (D/V; Handoberseite-Innenfläche), ,proximodistal' Achsen als (P/D; Handgelenk-Fingerspitzen) und ,anteroposterior' (A/P; Daumen-kleiner Finger) bezeichnet (Abb. 2). Im Fokus der vorliegenden Arbeit liegt die Regulation der Anzahl und der anteroposterioren Anordnung der Finger bzw. Zehen im Autopoden. Das autopodiale Skelett von Maus und Mensch weist hierbei eine erstaunliche Übereinstimmung auf. Der anteriorste Finger bzw. Zeh ist relativ kurz und besteht aus zwei Fingerknochen, die man als Phalangen bezeichnet. Die vier posterioren Finger/Zehen besitzen einen zusätzlichen Phalanx und sind



somit triphalangeal (Abb. 3). Die folgenden Kapitel enthalten eine Übersicht der Erkenntnisse, die bisher über die Regulation der A/P-Achse des Autopoden der Vertebraten gewonnen werden konnten.

**Abb. 3 Die drei Raumachsen der Hand.** Am Beispiel einer menschlichen Hand verdeutlicht das Diagramm die drei Raumachsen, die für Beschreibungen von anatomischen Positionen notwendig sind: Dorsalventral (Handoberseite-Innenfläche), proximal-distal (Handgelenk-Fingerspitzen) und anterior-posterior (Daumen-kleiner Finger). Der Daumen oder auch die Großzehe bestehen aus zwei Segmenten, die posterioren Finger/Zehen aus jeweils drei (Abbildung modifiziert nach Tickle, 2006).

#### 1.2.2 Die Zone polarisierender Aktivität

Gerade der Anblick der Hände und Füße eines neugeborenen Babys ist oftmals ein zuverlässiger Auslöser, um auch in dem unbefangensten Betrachter die Frage zu wecken, wie eine derartig erstaunliche Komplexität in völliger Selbstorganisation entstehen kann. Eine erste Annäherung an diese Problematik wurde von Lewis Wolpert entwickelt (Wolpert, 1969). Im Zentrum seines Konzeptes standen dabei die Positionsinformationen, die eine Zelle notwendigerweise empfangen muss, um ihren Platz im jeweiligen Entwicklungskontext zu erfahren und damit ihrer Aufgabe gerecht werden zu können. Diese Positionsinformationen sollten von bestimmten Signalzentren vermittelt und von diesen in Form von diffundierbaren Molekülen, sogenannten Morphogenen, ausgesendet werden. Mit der für jede Zelle bzw. gruppe unterschiedlichen räumlichen Beziehung zum Signalzentrum sollte ein Konzentrationsgradient des Morphogens entstehen, der für jede Position entlang des Gradienten spezifisch wäre und so die Festlegung eindeutiger Zellidentitäten ermöglichen sollte.

Die Musterbildung entlang der anteroposterioren Achse der distalen Gliedmaße der Vertebraten - beim Menschen also vom Daumen bis zum kleinen Finger - hat sich als ein besonders gutes Untersuchungsobjekt erwiesen, um die zugrunde liegenden Mechanismen der embryonalen Musterbildung zu studieren. Klassische chirurgische Experimente an Hühnerembryonen konnten zeigen, dass eine Zellgruppe im posterioren Mesenchym der frühen Gliedmaßenknospe die Fähigkeit besitzt, die anteroposteriore Achse dramatisch umzuorganisieren (Abb. 4; Saunders et al., 1968). Wenn eine solche Zellgruppe in die anteriore Seite einer zweiten Gliedmaßenknospe transplantiert wurde, konnte sie die Ausbildung einer spiegelbildlichen Verdopplung der Autopodenelemente des Hühnerflügels induzieren (Abb. 4; Saunders et al., 1968). Diese posteriore Zellpopulation erhielt aufgrund ihrer besonderen Fähigkeit den Namen "Zone polarisierender Aktivität" (ZPA). Die zusätzlichen Flügelstrahlen (die Äquivalente zu unseren Fingern) gingen dabei nicht etwa aus dem transplantierten Gewebe selbst hervor, sondern bildeten sich aus Zellen des Empfängerembryos. Dies sprach dafür, dass die ZPA die Quelle eines Morphogens darstellte. Vor nicht einmal 15 Jahren wurde gezeigt, dass es sich dabei um das sekretierte Protein Sonic hedgehog (SHH) handelte, das von den Zellen der ZPA exprimiert wird und für die Funktion der ZPA entscheidend ist (Riddle et al., 1993).



Abb.4 Transplantationsexperimente zur Entdeckung der Zone polarisierender Aktivität (ZPA). (A) Schema der frühen Flügelknospe eines Hühnerembryos (AER: apical ectodermal ridge, s. Kapitel 1.2.5), die als Ausbeulung an der Flanke des Embryos sichtbar wird. Das grüne Kästchen kennzeichnet die Region des posterioren Mesenchyms, das operativ entfernt und, wie in (B) dargestellt, in das anteriore Mesenchyms einer zweiten Knospe transplantiert wurde. (C) Schema des Knochenskeletts eines unbehandelten Hühnerflügels. (D) Die anteriore Transplantation von etwa 30 Zellen der posterioren Mesenchymregion führt zur Duplikation des anteriorsten Flügelstrahls. (E) Eine vollständige, spiegelsymmetrische (gestrichelte Achse) Verdopplung der Flügelstrahlen wird bei Transplantation von etwa 120 Zellen erreicht. (Das Bildmaterial dieser Abbildung entstammt Tickle, 2006).

#### 1.2.3 Die Funktion von SHH in der Gliedmaßenentwicklung

Die oben erwähnten Transplantationsexperimente, die zur Entdeckung der ZPA geführt haben, verdeutlichten bereits eindrucksvoll, dass die Begrenzung der SHH-Expression auf das posteriore Mesenchym von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des Hühnerflügels ist. Weiterführende Experimente erbrachten genauere Einblicke in die Funktion von SHH. So führte die anteriore Transplantation von nur etwa 30 ZPA-Zellen zur Ausbildung eines einzelnen zusätzlichen Flügelstrahls, der anteriore Identität besaß (Abb. 4D; Tickle et al., 1981). Eine Transplantation von 130 Zellen reichte hingegen aus, um in der vollständigen spiegelbildlichen Verdopplung des Autopoden zu resultieren. Die Flügelstrahlen anteriorer Identität entstanden in diesem Falle an zentraler Position, also in der größten Entfernung zu den beiden SHH-Quellen (Abb. 4E; Tickle et al., 1981). Die Wirkung von SHH ist demnach offenbar dosisabhängig, wobei für die Entstehung der posterioren Zehen eine größere SHH-Menge notwendig ist.

Die elementare Bedeutung von SHH für die normale Gliedmaßenentwicklung offenbart sich am deutlichsten in SHH-defizitären Mutanten. Der Huhnmutante *oligozeugodactyly*, die kein SHH in den Gliedmaßenknospen exprimiert, fehlen nahezu alle Elemente des Autopoden bis auf den anteriorsten Zeh in den Beinen (Ros et al., 2003). Analog zu der *oligozeugodactyly*-Huhnmutante fehlen auch  $Shh^{-/-}$ -Mausembryonen nahezu alle Autopodenelemente bis auf einen einzelnen Zeh in der Hintergliedmaße, dem man wie in der Huhnmutante eine anteriore Identität zugeschrieben hat (Abb. 5C (nur Vordergliedmaße); Chiang et al., 2001; Kraus et al., 2001). Trotz der offensichtlichen anatomischen Unterschiede zwischen den Gliedmaßen der verschiedenen Vertebratenspezies ist die Funktion von SHH in der ZPA also bemerkenswert konserviert. Eine weitere Huhn-Maus-Analogie ergibt sich durch die Mausmutante *hemimelic extra-toes* (*Hx*). Ähnlich zu der im Hühnerembryo durch Transplantation einer zweiten ZPA künstlich herbeigeführten Situation entsteht aufgrund der *Hx*-Mutation eine zweite *Shh*-Expressionsdomäne im anterioren Mesenchym der Gliedmaßenknospe. Dies führt zu einer ausgeprägten Polydakytlie (Vielfingrigkeit) und zum Verlust der anterioren Zehenidentität (Clark et al., 2001).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Wirkung von SHH dosisabhängig ist und dass sich die SHH-Menge vor allem auf zwei Parameter der distalen Gliedmaßenentwicklung auswirkt. Zum einen hat SHH einen fördernden Effekt auf die Zahl der Zehen/Flügelstrahlen. Zum zweiten bleibt festzuhalten, dass SHH die anteroposteriore Achsenausbildung beeinflusst; und zwar derart, dass größere Mengen von SHH einerseits die Entstehung posteriorer Zehenidentitäten begünstigen, während sie andererseits der Entstehung anteriorer Zehenidentität entgegenwirken.

#### 1.2.4 Die GLI-Familie in der Entwicklung der distalen Gliedmaße

Als sich die Bedeutung von SHH als essentiellem Morphogen der Gliedmaßenentwicklung immer mehr verfestigte, lag die Vermutung nahe, dass die GLI-Proteinfamilie ebenfalls entscheidend an der Gliedmaßenentwicklung beteiligt sein würde, da sie, wie oben beschrieben, die Transkriptionsfaktoren des Hedgehog-Signalwegs in Vertebraten stellt. Weitere Unterstützung für diese These ergab sich daraus, dass alle GLIs in der Gliedmaßenknospe exprimiert werden (Büscher und Rüther, 1998). Es war somit anzunehmen, dass der SHH-Gradient dadurch Einfluss auf die Musterbildung nehmen würde, indem er in positionsspezifische Aktivitätsmuster der verschiedenen GLIs umgesetzt werden würde. Umso überraschender war die Erkenntnis, dass weder GLI1 noch GLI2 für die Gliedmaßenentwicklung von essentieller Bedeutung sind (Mo et al., 1997; Park et al., 2000). Als offenbar einziges Mitglied der Familie scheint GLI3 eine unverzichtbare Funktion während der Gliedmaßenentwicklung auszuüben (Johnson, 1967; Schimmang et al., 1992; Hui und Joyner, 1993) Bereits der Funktionsverlust eines Gli3-Allels zieht eine präaxiale Polydaktylie (eine Zehenduplikation auf der anterioren Seite) in Vorder- und Hinterbeinen von Gli3<sup>+/-</sup>-Tieren nach sich (Johnson, 1967; Hui und Joyner, 1993). Die sonstige Erscheinung der heterozygoten Tiere ist nicht auffällig und auch die Lebens- und Fortpflanzungsfähigkeit scheint unbeeinträchtigt. Der völlige Funktionsverlust von GLI3 in homozygoten *Gli3<sup>-/-</sup>*-Tieren führt dann allerdings auch in anderen Organen zu gravierenden Entwicklungstörungen, die in utero oder kurz nach der Geburt den Tod der Embryonen bzw. Neugeborenen zur Folge haben. Das Auftreten von Gliedmaßenveränderungen als einzigem Symptom heterozygoter *Gli3*<sup>+/-</sup>-Mäuse macht deutlich, dass die Gliedmaße ein sehr sensitives System darstellt, in dem sich Gli3-betreffende Veränderungen besonders gut verfolgen lassen. In homozygoten Gli3<sup>-/-</sup>-Tieren nehmen die Fehlbildungen der Gliedmaßen nochmals an Schwere zu. Die Polydaktylie ist wesentlich ausgeprägter und die Pfoten lassen nicht mehr die wildtypische anteroposteriore Asymmetrie erkennen, sondern zeigen eine paddelförmige Silhouette (Johnson, 1967). Aufgrund des weitreichenden Verlustes der charakteristischen individuellen Unterschiede der Zehen, gehen die meisten bisherigen Untersuchungen davon aus, dass die Zehen von Gli3<sup>-/-</sup>-Embryonen keine anteroposterioren Identitäten besitzen (vgl. Abb. 5A und 5B).

GLI3 ist also, wie SHH auch, sowohl an der Regulation der Zehenzahl als auch an der Festlegung der Zehenidentitäten beteiligt. Dabei gibt es aber offensichtliche Unterschiede zwischen den beiden Faktoren. Da *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen polydaktyl sind, ist davon auszugehen, dass sich GLI3, im Gegensatz zu SHH, begrenzend auf die Zehenzahl auswirkt. Angesichts der Fehlbildungen von sowohl anterior als auch posterior gelegenen Zehen in *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen bleibt außerdem festzuhalten, dass sich der Verlust von GLI3 auf alle Zehenidentitäten auswirkt, wohingegen der Ausfall von SHH zumindest in den Hintergliedmaßen nur die Entstehung der vier posterioren Zehenidentitäten zu betreffen scheint.

## 1.2.5 Die anteroposteriore Musterbildung unter Kontrolle eines SHH-regulierten GLI3-Isoform-Gradienten

In den letzten Jahren konnte das Verständnis über die Funktion des SHH-Signalwegs beträchtlich erweitert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von SHH durch die Zellen der ZPA erforderlich ist, um das Fortbestehen eines zweiten, für das Auswachsen der Gliedmaße entscheidenden Signalzentrums zu gewährleisten (Niswander et al., 1994). Bei diesem zweiten Zentrum handelt es sich um die sogenannte apikale ektodermale Leiste (engl.: apical ectodermal ridge, AER; Abb. 4A); eine schmale wulstartige Struktur, die sich am distalen Ende der frühen Gliedmaßenknospe entlang der Grenze von ventralem und dorsalem Ektoderm ausbildet (Übersicht in: Capdevila und Izpisua Belmonte, 2001). Die AER übt ihre Funktion durch Sekretion von mindestens 4 verschiedenen FGF-Proteinen (FGF4, -8, -9 und -17) aus. Der Verlust der AER bzw. der Verlust der entsprechenden FGF-Proteine führt zu einem vorzeitigen Abbruch des Auswachsen der Gliedmaßenknospe und somit auch zum Verlust des Autopoden (Boulet et al., 2004). In der wildtypischen Gliedmaßenknospe wird die AER dadurch stabilisiert, dass SHH die Expression von Gremlin im posterioren Mesenchym induziert (Zuniga et al., 1999; Capdevila et al., 1999). Gremlin ist ein Inhibitor des BMP-Signalwegs und als solcher essentiell für die Aufrechterhaltung der Fgf-Expression und die Integrität der gesamten AER, da sich die Aktivität von BMPs negativ auf die Aufrechterhaltung der AER auswirkt (Hsu et al., 1998; Pizette et al., 1999, Khokha et al., 2003). Dies zeigt sich deutlich in Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen, in denen die Gremlin-Expression fast völlig ausbleibt, woraufhin die AER mit den oben beschriebenen Konsequenzen degeneriert (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002B). Umgekehrt sind aber auch die FGF-Signale aus der AER notwendig, um die Shh-Expression in der ZPA aufrechtzuerhalten (Niswander et al., 1994; Laufer et al., 1994). Es besteht also eine gegenseitige fördernde Abhängigkeit zwischen AER und ZPA, positiven die man als SHH/FGF-Rückkopplungsmechanismus (engl.: SHH/FGF feedback loop) bezeichnet.

Bis vor wenigen Jahren war man allgemein der Ansicht, dass der wachstumsfördernde Einfluss von SHH für die Entwicklung der Gliedmaße zwingend notwendig sei und dass ohne SHH höchstens distale Rudimente entstehen könnten. Die Aufgabe von GLI3 innerhalb der Gliedmaßenentwicklung wurde aufgrund des gegensätzlichen Phänotyps von *Shh<sup>-/-</sup>*- und *Gli3<sup>-/-</sup>*-Mutanten dahingehend interpretiert, dass GLI3 dazu nötig sei, den unabdingbaren Einfluss von SHH auf das normale Maß zu begrenzen. Die Hauptursache für die Entstehung einer Polydaktylie wurde deshalb im Allgemeinen in einer Überaktivität von SHH gesehen, die entweder durch ein Fehlen von GLI3 (siehe *Gli3*-Null-Mutante) oder auch durch andere

Gründe (siehe *Hx*-Mutante, Kapitel 1.2.3) hervorgerufen werden kann (Masuya et al., 1995; Büscher et al., 1997; Wang et al., 2000).

Zwei nahezu zeitgleich erschienene Veröffentlichungen revolutionierten diese Sichtweise jedoch (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002B). Die Autoren dieser Berichte zeigten, dass Gli3<sup>-/-</sup>; Shh<sup>-/-</sup>-Mutanten ungeachtet des Verlustes von SHH polydaktyle Gliedmaßen entwickelten, die in Knochen-Knorpel-Färbungen ununterscheidbar von den Gliedmaßen ihrer  $Gli3^{-/-}$ -Wurfgeschwister waren (vgl. Abb. 5B und 5E; Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002B). Entgegen der bis dahin akzeptierten, möglicherweise auch durch die Chronologie der Entdeckungen geprägten Gewichtung, dass SHH einen unverzichtbaren Einfluss hätte, der durch GLI3 lediglich moduliert werden würde, sprachen die neuen Ergebnisse nun dafür, dass die Zehenlosigkeit von  $Shh^{--}$ -Mutanten ein sekundärer Effekt des Verlustes von SHH wäre. Denn da bei Abwesenheit von GLI3 ein zusätzlicher Verlust von SHH ohne weitere Folgen blieb (vgl. Abb. 5B und 5E), ist anzunehmen, dass jegliche Aktivität von SHH in der Gliedmaßenentwicklung zwingend über GLI3 vermittelt wird. Als entscheidenden Grund für die Zehenlosigkeit von  $Shh^{-/-}$ -Mutanten sieht man nun an, dass es ohne den inhibierenden Einfluss von SHH auf die GLI3-Prozessierung zu einer drastischen Steigerung der Prozessierungsrate kommt. Das dadurch vermehrt vorliegende, kurze GLI3-Repressorprotein, GLI3R, führt durch Reprimierung der Gremlin-Expression schließlich zu dem Zusammenbruch des SHH/FGF-Rückkopplungsmechanismus und damit unweigerlich zu dem beschriebenen, fast vollständigen Verlust des Autopoden in Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen (Aoto et al., 2002; Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002B). Aufgrund dessen wird der für GLI3 bereits seit längerem bekannte, negative Einfluss auf die Zehenzahl nun vor allem der GLI3R-Isoform zugeschrieben.



Abb.5 Die Zehenzahl und -identität scheint das Ergebnis der durch SHH regulierten GLI3-Prozessierung zu sein. Die Fotos zeigen Knochen-Knorpel-Färbungen der Vorderpfoten von Mausembryonen an Tag E16.5 ihrer Entwicklung. Das wildtypische Pfotenskelett (A) erfährt durch den Verlust von GLI3 (B) oder SHH (C) eine große, wenn auch sehr unterschiedliche Veränderung. (B) In  $Gli3^{-/-}$ -Mutanten nimmt die Zahl der Zehen stark zu, dabei geht die wildtypische Asymmetrie der Zehenidentitäten verloren.

(C) In den Vordergliedmaßen von  $Shh^{-\prime-}$ -Mutanten wird an der Position des Autopoden nur ein Knorpelelement (Pfeil) gebildet. (D, E) Ein Verlust von GLI3 wirkt sich in quantitativer Weise positiv auf die Bildung autopodialer Elemente in SHH-defizitären Mutanten aus. (D) Der Funktionsverlust eines *Gli3*-Allels in  $Shh^{-\prime-}$ -Mutanten führt zur Entstehung von deutlich mehr autopodialen Elementen als in  $Shh^{-\prime-}$ -Mutanten. (E) Der vollständige Verlust von GLI3-Funktion führt trotz gleichzeitigem SHH-Ausfall zu polydaktylen Gliedmaßen. Ein morphologischer Unterschied zu *Gli3*<sup>-/-</sup>-Einzelmutanten ist weder hinsichtlich der Zehenzahl noch hinsichtlich der weiterhin fehlenden Zehenidentität zu erkennen (Bildmaterial aus Litingtung et al., 2002).

Hinsichtlich der Regulation der anteroposterioren Musterbildung bzw. der daraus hervorgehenden verschiedenen Zehenidentitäten wurde vorgeschlagen, dass das an der jeweiligen Zehenposition existierende Verhältnis der beiden GLI3-Isoformen zueinander (GLI3-FL:GLI3R) ausschlaggebend für die Identität einer Zehenanlage wäre (Litingtung et al., 2002). Herauszufinden, zu welchen molekularen Unterschieden zwischen den Zehenidentitäten die Abstufungen des mutmaßlich verantwortlichen GLI3-Isoform-verhältnisses führen, hat sich allerdings als schwierig herausgestellt.

In einem anderen typischen Modellsystem der entwicklungsbiologischen Forschung waren ähnliche Bemühungen weitaus erfolgreicher. Die Musterbildung im ventralen Neuralrohr, dem Vorläufer des späteren Rückenmarks, beruht auf einem SHH-Signal, das von einer ventral gelegenen Zellgruppe, der Bodenplatte, sekretiert wird. Entlang des sich daraus ergebenden, dorsoventralen SHH-Gradienten entstehen die verschiedenen Neuronentypen entsprechend ihrer jeweiligen Position im SHH-Gradienten. Es konnte gezeigt werden, dass diese verschiedenen Neuronenpopulationen unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen, anhand derer sie eindeutig zu identifizieren sind (Übersicht in: Wilson und Maden, 2005). Im Gegensatz zu den distinkten Neuronen und Interneuronen des späteren Rückenmarks setzen sich in der Gliedmaße die entsprechenden Positionen entlang des SHH-Gradienten, sprich die Zehen, jedoch alle aus denselben Zelltypen zusammen. Die individuellen Unterschiede, die dennoch zwischen den einzelnen Zehen bestehen, sind für die Funktionalität der Gliedmaße zwar von essentieller Bedeutung, äußern sich allerdings lediglich in unterschiedlicher Länge und Anzahl der Phalangen. Es ist daher durchaus denkbar, dass sich die Unterschiede zwischen benachbarten Zehen eher aufgrund subtiler Modulationen eines grundsätzlich identischen Genaktivitätsmusters ausbilden, statt, wie im Neuralrohr, das Ergebnis eines spezifischen, für jede Identität charakteristischen Expressionsprofils zu sein. Für diese These spricht, dass es trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet bislang kaum gelungen ist, einzelnen Zehenidentitäten individuelle Transkriptionsmuster zuzuordnen, die eine eindeutige Identifizierung einzelner Zehenidentitäten erlauben würden. Lediglich für die anteriorste

Zehenidentität konnte gezeigt werden, dass sie sich durch das Fehlen von *Hoxd12*-Expression von allen anderen Zehenanlagen unterscheidet (Chiang et al., 2001). Für die posterioren Zehenidentitäten wurde kürzlich berichtet, dass die posteriore Expression von *Tbx2* und *Tbx3* zur Spezifizierung der beiden posteriorsten Zehenidentitäten beitragen könnte (Suzuki et al., 2004). Wie auch immer die feinen Unterschiede zwischen den Zehenidentitäten letztendlich realisiert werden, festzuhalten bleibt in jedem Fall, dass nach heutigem Kenntnisstand das Muster der verschiedenen Zehenidentitäten durch das Zusammenspiel von SHH und GLI3 festgelegt wird, wobei die anteriore Zehenidentität im Bereich der höchsten GLI3R-Konzentration und die posteriorste Identität in der engsten Nachbarschaft zur SHH-Quelle entstehen.

#### **1.3 Die klinische Relevanz des Hedgehog-Signalwegs**

Die Komplexität des Hedgehog-Signalwegs bietet zahlreiche Ebenen, auf denen es zu Störungen der Signalprozesse kommen kann. Da der HH-Signalweg außerdem während der gesamten Lebensspanne, von früher Embryonalentwicklung bis hin zum adulten Organismus, umfassende Aufgaben erfüllt, ist es nicht verwunderlich, dass es mittlerweile eine große Anzahl von Krankheiten gibt, die entweder direkt auf Störungen dieses Signalwegs zurückgehen oder bei denen sich durch Manipulation des Signalwegs zumindest Therapiemöglichkeiten eröffnen könnten. Letzteres erhofft man sich z.B. bei Diabetes, da HH an der Regulation der Insulin-Produktion und damit vermutlich auch an der Pathogenese von Typ 2 Diabetes beteiligt ist (Thomas et al., 2000). Die Rolle von SHH in der Entwicklung des Nervensystems wird zudem als viel versprechender Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen in neurodegenerativen Krankheiten gesehen. So haben mehrere Studien die neuroprotektive Funktion von SHH in Tiermodellen für die Parkinson-Krankheit oder Erkrankungen des peripheren Nervensystems hervorgehoben (Übersicht in: Dellovade et al., 2006). Unter den Krankheiten, deren Ursache direkt mit einer Störung des HH-Signalwegs verbunden ist, treten vor allem zwei große Gruppen hervor: angeborene Fehlbildungen und Tumorerkrankungen.

#### 1.3.1 Durch Störungen des Hedgehog-Signalwegs hervorgerufene Krankheiten

Unter die auf Mutationen innerhalb des HH-Signalwegs zurückgehenden, angeborenen Fehlbildungen fallen natürlich auch die durch Defekte in GLI3 verursachten Entwicklungsstörungen. Sie werden wegen ihrer besonderen Bedeutung für diese Arbeit jedoch in einem eigenen Kapitel (1.3.2) behandelt. An dieser Stelle seien deshalb nur zwei Beispiele embryonaler Fehlbildungen genannt, die sich auf Mutationen in anderen Genen des Signalwegs zurückführen lassen. So verursacht die Haploinsuffizienz des SHH-Liganden Holoprosenzephalie (HPE), eine schwere vorgeburtliche Missbildung (Roessler et al., 1996). HPE entsteht durch unvollständige oder fehlende Differenzierung des Prosenzephalon in seine beiden cerebralen Hemisphären, was sich äußerlich in der Verformung des Schädels und in der Verminderung des Augenabstandes bis hin zur Zyklopie, der Ausbildung eines einzelnen, zentral gelegenen Auges, manifestiert (Incardona und Roelink, 2000; Cohen und Shiota 2002; Ming et al., 2002). HPE ist eine häufige Ursache für spontane Schwangerschaftsabbrüche, was sich daran zeigt, dass HPE in 1 von 250 Abtreibungen zu finden ist, wohingegen nur 1 von 16.000 Neugeborenen betroffen ist (Cohen, 1989). HPE bzw. HPE-ähnliche Symptome können auch durch Mutationen in GLI2 oder PTC1 hervorgerufen werden (Roessler et al., 2003, Ming et al., 2002). Eine andere mögliche Auswirkung von Mutationen im Rezeptor PTC ist die Entstehung des Gorlin-Goltz-Syndroms (Hahn et al., 1996). Auch in diesem Fall sind sowohl die Skelett- als auch die Gehirnentwicklung betroffen. Charakteristisch für dieses auch als Basalzellnävussyndrom bezeichnete Tumor- und Fehlbildungssyndrom ist jedoch die Entstehung von Basalzellnävi, die sich meist schon im jugendlichen Alter zu Basalzellkarzinomen entwickeln (High et al., 2005).

Meist sind es jedoch nicht Mutationen in der Keimbahn, sondern somatische Mutationen, die zu der Entstehung von Karzinomen führen. Die Liste der Krebserkrankungen, bei denen eine Beteiligung des HH-Signalwegs entdeckt worden ist, wächst ständig. Kürzlich veröffentliche Daten legen dar, dass darunter so häufige Krebsformen wie kleinzelliger Lungenkrebs, Prostata-, Bauchspeicheldrüsen-, Magen- und Darmkrebs zu finden sind (Berman et al., 2003; Karhadkar et al., 2004; Watkins et al., 2003; Thayer et al., 2003; Sheng et al., 2004; Sanchez et al., 2004; Fan et al., 2004). Bei sporadischen Basalzellkarzinomen, der häufigsten Tumorerkrankung überhaupt, lassen sich mindestens 80% der Fälle auf Mutationen (70% PTC; 10% SMO) zurückführen, die zu einer Überaktivität des HH-Signalwegs führen (Bale und Yu, 2001; Reifenberger et al., 2005; Reifenberger, 2007). Ein weiterer Grund, warum der HH-Signalweg mehr und mehr in den Fokus der Krebsforschung rückt, ist die Tatsache, dass er an allen Entwicklungsstufen von einer gutartigen Neoplasie hin zu einem bösartigen Tumors beteiligt zu sein scheint (Übersicht in Kasper, 2006). Dazu zählen Proliferationsstimulation, Inhibierung des programmierten Zelltods/Apoptose und schließlich

Verstärkung der Invasions- und Metastasierungstendenz durch Aktivierung der Epithel-Mesenchym-Transition.

Angesichts des breiten Spektrums der unter dem Einfluss des HH-Signalwegs stehenden Erkrankungen besteht ohne Zweifel dringender Bedarf, diesen Signalweg in seiner Komplexität besser zu verstehen, um die bestmöglichen Ansatzpunkte für Therapien identifizieren zu können. Da der überwiegende Anteil der bisherigen Erkenntnisse zum HH-Signalweg durch das Studium von Entwicklungsstörungen gewonnen wurde, verspricht diese Forschungsrichtung auch für die Zukunft eine wertvolle Informationsquelle zu sein.

#### 1.3.2 GLI3-assoziierte Störungen der Embryonalentwicklung

Mutationen in *GLI3* werden für mindestens fünf autosomal dominant vererbte Fehlbildungserkrankungen verantwortlich gemacht, die sich zwar durch zum Teil sehr spezifische Krankheitsbilder auszeichnen, denen aber allen gemein ist, dass sie Störungen der Gliedmaßenentwicklung beinhalten (Übersicht bei Biesecker, 1997; Nieuwenhuis und Hui, 2005). Während bei zwei der fünf Fehlbildungserkrankungen sogar ausschließlich die Extremitäten betroffen sind, bringen die drei Syndrome pleiotrope Organveränderungen mit sich.

Mit wachsender Zahl der identifizierten, pathogenen GLI3-Mutationen schien es teilweise, dass zwischen Art und Position der Mutation und der daraus resultierenden Krankheit kein eindeutiger Zusammenhang bestehen würde (Kalf-Susske et al., 1999; Radhakrishna et al., 1999). Infolgedessen wurde vorgeschlagen, dass die GLI3-assoziierten Fehlbildungen nicht als verschiedene Krankheiten mit individuellen Ursachen gelten könnten, sondern nur graduell unterschiedliche Ausprägungen eines gemeinsamen Problems darstellten (Radhakrishna et al., 1999). Um der fehlenden Korrelation von Geno- und Phänotyp Rechnung zu tragen, wurde deshalb der zusammenfassende Begriff der "GLI3-Morphopathien" geprägt (Radhakrishna et al., 1999). Jüngere Untersuchungen belegten jedoch, dass es zumindest zwischen zwei der ernsteren Erkrankungen, dem Pallister-Hall- und dem Greig-Syndrom, einen deutlichen Unterschied in der Art und Position der jeweils verantwortlichen GLI3-Mutation gibt (Johnston et al., 2005). Dadurch wurde nicht nur ermöglicht, auf Grundlage einer Mutation eine robuste Vorhersage der zu erwartenden Komplikationen treffen zu können, wenn dies beispielsweise bei einer genetischen Beratung werdender Eltern nötig werden sollte. Zusätzlich war es gelungen, jeder der beiden Krankheiten eine bestimmte Gruppe von Mutationen zuzuordnen, wodurch sich eine

Klassifizierung hinsichtlich der jeweils ursächlichen, pathogenen Veränderung der GLI3-Proteinfunktion abzeichnete.

#### 1.3.2.1 Präaxiale Polydaktylie Typ IV (PPD IV)

Als präaxiale Polydaktylie wird das Vorhandensein eines zusätzlichen Fingers/Zehs auf der Seite des Daumens bzw. der Großzehe bezeichnet, was je nach Ausprägung, wie z.B. Zahl der Phalangen, in verschiedene Klassen unterteilt wird (PPD I-III). PPD IV zeichnet sich neben präaxialer Polydaktylie zusätzlich durch Syndaktylie zwischen dem dritten und vierten Finger bzw. dem zweiten und dritten Zeh aus (Schwabe und Mundlos, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass PPD IV durch heterozygot vorliegende Leserasterverschiebungen in *GLI3* hervorgerufen wird, die in einer verfrühten Termination des Proteins (1246 AS) resultieren (Radhakrishna et al., 1999).

#### 1.3.2.2 Postaxiale Polydaktylie Typ A und A/B (PAP-A; PAP-A/B)

Postaxiale Polydaktylie ist durch zusätzliche Finger oder Zehen an postaxialer Position (kleiner Finger/Zeh) gekennzeichnet. Es existieren zwei phänotypisch unterschiedliche Varianten. Typ A zeichnet sich dadurch aus, dass der zusätzliche Finger gut ausgebildet und gemeinhin funktionstüchtig ist (Schwabe und Mundlos, 2004). Bei der Untersuchung einer Familie mit 15 betroffenen Individuen konnte jeweils in einem Allel des *GLI3*-Gens die Deletion eines Nukleotids identifiziert werden, was zu einer Leserastermutation führte, die ein verkürztes GLI3-Protein (764 AS) voraussagte (Radhakrishna et al., 1997).

Im Gegensatz zu Typ A kommt es im Fall der PAP-B lediglich zur Ausbildung eines postaxialen Fingerrudiments/Hautanhängsels ohne Skelettelemente (Schwabe und Mundlos, 2004). Einige Patienten bzw. Familien, in denen heterozygot eine *GLI3*-Mutation vorlag, zeigten Charakteristika von Typ A und B und wurden deshalb als Typ A/B klassifiziert (Radhakrishna et al., 1999).

#### 1.3.2.3 Acrocallosal-Syndrom

Das Acrocallosal-Syndrom (ACS) ist eine seltene embryonale Fehlbildung, die 1979 zum ersten Mal beschrieben wurde (Schinzel, 1979; Philip et al., 1988). Die klinischen Kernmerkmale schließen postaxiale Polydaktylie, Verdopplung der Großzehe, Makrozephalie

und Fehlen des corpus callosum (der Faserverbindung zwischen den beiden Hirnhemisphären), sowie eine ausgeprägte Entwicklungsverzögerung ein. Obwohl eine Mutation von *GLI3* als Ursache des ACS zunächst ausgeschlossen worden war (Brueton et al., 1992), wurde in einer anderen Fallstudie ein heterozygot vorliegender Basenaustausch im letzten Exon von *GLI3* entdeckt, was in diesem Fall wahrscheinlich ursächlich für die Entwicklung des ACS war (Elson et al., 2002). Es ist deshalb davon auszugehen, dass sich hinter der Entstehung von ACS eine heterogene Gruppe von Ursachen verbirgt, zu denen unter anderem die Mutation von *GLI3* zählt.

#### 1.3.2.4 Greig Zephalopolysyndaktylie-Syndrom (Greig-Syndrom, GCPS)

Wie der Name schon beinhaltet, handelt es sich hierbei um einen von D.M. Greig zuerst beschrieben Symptomkomplex, der sowohl Schädel- und Gesichtsdysmorphien als auch Fehlbildungen der Extremitäten einschließt (Greig, 1926). Bei den Schädelanomalien handelt es sich häufig um einen vergrößerten Kopfumfang (Makrozephalie) bzw. um einen erweiterten Augenabstand in Verbindung mit hoher Stirn und einem verbreiterten Nasenrücken (Hypertelorismus); in einigen Fällen ist eine leichte geistige Behinderung zu verzeichnen. In den Gliedmaßen ist in der Regel eine postaxiale Polydaktylie der Hände bzw. eine präaxiale Polydaktylie der Füße vorhanden, sowie komplette (knöcherne Verbindung) oder inkomplette (nur Hautverwachsung) Syndaktylie zwischen drittem und viertem Finger bzw. erster bis dritter Zehe.

Als Ursache des GCPS wurden Mutationen in *GL13* identifiziert, die sich an scheinbar beliebiger Position im gesamten kodierenden Bereich von *GL13* befinden konnten (Wagner et al., 1990; Vortkamp et al., 1991, Wild et al., 1997; Kalff-Suske et al., 1999). Die Tatsache jedoch, dass in mehreren Fällen von GCPS umfangreiche Deletionen oder Translokationen in *GL13* identifiziert wurden, sowie Punktmutationen, die vor (5') oder auch innerhalb der für die DNA-Bindedomäne kodierenden Sequenzen lagen, spricht sehr dafür, dass die Ursache des GCPS in dem Funktionsverlust eines *GL13*-Allels zu suchen ist (Wagner et al., 1990; Vortkamp et al., 1991, Wild et al., 1997; Johnston et al., 2005). Weitere Unterstützung für die Annahme, dass GCPS verursachende Mutationen den Verlust der GL13-Funktion zur Folge haben, ergab sich durch die Analysen der *Extra toes* (*Xt*)-Mausmutante (Johnson, 1967). Vor allem auf Basis phänotypischer Übereinstimmungen wurde diese Mausmutante als Modell für das GCPS vorgeschlagen (Winter et al., 1988). Spätere Untersuchungen konnten dann demonstrieren, dass die Fehlbildungen der verschiedenen *Xt*-Mutanten tatsächlich auf

Mutationen in *GLI3* zurückzuführen sind, die für einen völligen Funktionsverlust von GLI3 sprechen (Vortkamp et al., 1992; Hui und Joyner, 1993). Deswegen geht man davon aus, dass GCPS verursachende Mutationen zum Funktionsverlust des betroffenen *GLI3*-Allels führen und GCPS somit aufgrund von GLI3-Haploinsuffizienz entsteht.

#### 1.3.2.5 Pallister-Hall-Syndrom (PHS)

In den ersten Berichten wurde das Pallister-Hall-Syndrom als ein neonatal letales Fehlbildungssyndrom beschrieben (Hall et al., 1980). In den dieser initialen Fallstudie zugrundeliegenden sechs Neugeborenen waren schwerwiegende Missbildungen wie imperforierter Anus (Anusatresie), gestörte Ausbildung der Lungenflügel, Dysplasie oder Agenesie der Nieren, Herzdefekte, hypothalamische Harmartome und das Fehlen des anterioren Teils der Hypophyse gefunden worden. Desweiteren zeigten sich leichte Fehlbildungen des Gesichtsschädels, gespaltene oder fehlende Kehldeckel, ein gespaltener Kehlkopf, Mikrophallus, Dysplasie der Nägel, Fehlstellungen der Nase und Ohren und eine intrauterine Wachstumsverzögerung. Die Fehlbildungen der Gliedmaßen bestanden aus einer verzögerten Mineralisierung der Extremitätenknochen, Fehlstellungen der Hüfte, Verkürzungen der Finger und Zehen, Syndaktylie und zentraler sowie postaxialer Polydaktylie.

Später folgende Berichte schilderten auch Fälle, die von weniger Defekten betroffen waren und die keine lebensbedrohlichen Fehlbildungen enthielten. Als diagnostische Kriterien wurden deshalb nur einige wenige Merkmale definiert, was dadurch möglich war, dass diese sehr spezifisch das Pallister-Hall-Syndrom charakterisieren. Für die Diagnosestellung von PHS wird gefordert, dass entweder (1) ein hypothalamisches Hamartom und zentrale Polydaktylie im Patienten selbst oder (2) ein Hamartom oder Polydaktylie in einem Verwandten des Patienten vorliegt (Biesecker et al., 1996). Das hypothalamische Hamartom ist eine während der Embryonalentwicklung entstehende, nur selten maligne entartende tumorartige Fehlbildung im Hypothalamus (Psychrembel Klinisches Wörterbuch, 257. Auflage). Das Hamartom kommt nur in insgesamt vier Syndromen vor, zentrale Polydaktylie wird als Merkmal von nur sechs Syndromen beschrieben (Johnston et al., 2005). Auch die Spaltung des Kehldeckels (Epiglottis) bietet ein recht verlässliches diagnostisches Zeichen, das ebenfalls selten in anderen Erkrankungen vorkommt. In der Praxis kommt jedoch den Gliedmaßenveränderungen äußerlich erkennbaren eine besondere Bedeutung als Früherkennungsmerkmal zu, da in schwereren Fällen, die neben den oben geschilderten

lebensbedrohlichen Problemen auch die Verengung der oberen Luftröhre beinhalten können, sofort Maßnahmen einzuleiten sind, um das Leben und die Gesundheit des Neugeborenen zu retten.

Die ersten entdeckten Mutationen in von PHS betroffenen Familien sagten eine Verkürzung von GLI3 voraus, wodurch das Protein bereits knapp C-terminal der DNA-bindenden Zinkfinger-Domäne enden würde (Kang et al., 1997). Spätere Untersuchungen an größeren Patientengruppen bestätigten und erweiterten diese Befunde. Sie zeigten, dass PHS verursachende Mutationen generell im mittleren Drittel des GLI3-Gens liegen und ein Cterminal verkürztes GLI3-Protein, GLI3<sup>PHS</sup>, prognostizieren, dessen DNA-Bindedomäne intakt ist (Johnston et al., 2005). Diese mutationsbedingte Verkürzung scheint demnach zu einem ähnlichen Produkt zu führen, wie die endogen durchgeführte Prozessierung von GLI3-FL zu GLI3R (siehe Kapitel 1.1.2.2). Da eine solche Auswirkung der PHS-verursachenden Mutationen zur Folge hätte, dass die normalerweise strenge Regulation der GLI3-Prozessierung und damit der Repressor-Menge unterlaufen wird, ist als molekulare Ursache von PHS ein Überschuss an GLI3-Repressoraktivität vorgeschlagen worden (Biesecker, 1997). Diese Theorie erfuhr 2002 durch die Vorstellung der Gli3<sup>2699</sup>-Mausmutante weitere Unterstützung (Böse et al., 2002; siehe auch Kapitel 1.4). Die in diese Mäuse eingebrachte Mutation ließ die Produktion eines C-terminal verkürzten GLI3-Proteins erwarten, dass in etwa der molekularen Größe des endogenen GLI3-Repressors entspräche (Wang et al., 2000; Böse et al., 2002). Da der Phänotyp dieser Mausmutante zudem eine umfassende Phänokopie des PHS-assoziierten Symptomspektrums darstellte, schien dadurch die These der gesteigerten GLI3-Repressoraktivität als Krankheitsursache von PHS bestätigt (Böse et al., 2002). Zwei noch im selben Jahr veröffentlichte Berichte erschütterten diese These jedoch, indem sie anhand von Untersuchungen zur Gliedmaßenentwicklung von Gli3---; Shh----Mausmutanten überzeugend darlegten, dass ein Übermaß von GLI3R-Aktivität zu einer drastischen Reduzierung der Zehenzahl führt (Abb. 5; Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002). Diese Berichte kollidierten eindeutig mit der bisherigen Theorie zur Ursache von PHS, denn die Polydaktylie von PHS-Patienten und homozygoten Gli3<sup>2699</sup>-Mäusen schien angesichts der neuen Ergebnissen mit einer reinen Steigerung der GLI3-Repressoraktivität unvereinbar zu sein. Somit war also fraglich, inwieweit die pathogenen, verkürzten GLI3-Proteine, GLI3<sup>PHS</sup> und GLI3<sup>△699</sup>, in ihrer Wirkung tatsächlich dem wildtypischen GLI3R-Protein entsprachen.

Wie sehr durch diese Datenlage eine Neuformulierung zum molekularen Hintergrund von PHS erschwert wurde, ist deutlich daran zu erkennen, dass dieses Problem weder von Seiten der Entwicklungsbiologen, noch von Seiten der mit diesem Thema befassten Mediziner aufgegriffen wurde. In aktuellen entwicklungsbiologisch orientierten Übersichtsartikeln zur Gliedmaßenentwicklung galt die Polydaktylie der *Gli3<sup>Δ699</sup>*-Mutante bestenfalls als noch zu klärendes Kuriosum (Motoyama, 2006), meistens fand sie trotz eindeutigem thematischen Bezug überhaupt keine Erwähnung (Talamillo et al., 2005; McGlinn und Tabin, 2006; Robert und Lallemand, 2006; Tickle, 2006). Auch in der medizinischen Fachpresse wurde das Problem ignoriert, stattdessen wurde weiterhin die zehn Jahre alte und offensichtlich neu zu diskutierende Repressorüberschuß-These als Erklärung für PHS angeführt (Johnston et al., 2005; Biesecker, 2006). Dieser auf beiden Seiten vorherrschende Stillstand zeigt, wie dringend eine Neuformulierung der Theorie zur molekularen Ursache des PHS auf eine genauere Vorstellung der Funktion von GLI3<sup>PHS</sup> angewiesen ist. Die Analyse des PHS-Mausmodells *Gli3<sup>Δ699</sup>* stellt hierzu sicherlich eine der vielversprechendsten Möglichkeiten dar.

#### 1.4 Die *Gli3<sup>△699</sup>*-Mausmutante

Die *Gli3*<sup>4699</sup>-Mausmutante wurde vor wenigen Jahren als Mausmodell für das Pallister-Hall-Syndrom (PHS) vorgestellt, da sowohl hinsichtlich der prognostizierten Veränderung des GLI3-Proteins als auch in der Symptomatik eine große Ähnlichkeit zwischen dieser Mausmutante und PHS-Patienten bestand (Böse et al., 2002). Zwar sind im Unterschied zu dem autosomal-dominant vererbten PHS in heterozygoten *Gli3*<sup>4699/+</sup>-Tieren keine größeren Auffälligkeiten zu beobachten gewesen, in homozygoten Embryonen, die alle kurz nach der Geburt verstarben, traten jedoch multiple Organfehlbildungen auf, die umfassende Übereinstimmungen mit dem in PHS-Patienten beobachteten Symptomspektrum hatten. Die Entwicklung der Wirbelsäule, der Schädelbasis, des Kehlkopfes, des Gastrointestinaltrakts und des Anus, sowie der Nieren und Nebennieren war von der *Gli3*<sup>4699</sup>-Mutation betroffen. Für die Gliedmaßen wurde eine Dysplasie der Nägel, eine zentrale Polydaktylie und Syndaktylie und eine proximodistale Verkürzung der Gliedmaße insgesamt beschrieben (Böse et al., 2002).

Die  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante ging aus einer Versuchsreihe hervor, die zum Ziel hatte, verschiedene GLI3-assoziierte, humane Erkrankungen in der Maus nachzubilden (Böse, 2001). Die durch homologe Rekombination eingebrachte Mutation, die letztendlich die  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante hervorbrachte, sollte ursprünglich durch einen Basenaustausch in Exon 14 eine Leserasterverschiebung hervorrufen und dadurch in einem verkürzten GLI3-Protein von 744

Aminosäureresten (AS) resultieren. Die Analyse des mutanten Transkripts ergab jedoch, dass eine nicht vorhergesehene Prozessierung (,splicing') des Primärtranskripts dazu führt, dass die aus *Gli3* stammende Sequenz bereits mit dem Exon 13, und damit nach 699 AS, endet. Daran schließt sich eine nicht aus *Gli3*, sondern aus dem Mutagenesekonstrukts stammende Sequenz an, die für zusätzliche 21 Aminosäuren kodiert, bevor ein Stopcodon die weitere Translation unterbindet (Böse et al., 2002).

Angesichts von Berichten, die die Prozessierungsstelle von GLI3 im Bereich zwischen 700-740 AS lokalisierten, sprach die Analyse des  $Gli3^{\Delta 699}$ -Transkripts dafür, dass die molekulare Größe von  $GLI3^{\Delta 699}$  der des natürlich vorkommenden GLI3-Repressors, GLI3R, sehr nahe kommen würde (Wang et al., 2000; Böse et al., 2002). Auch die mutmaßliche molekulare Größe der pathogenen, verkürzten GLI3-Proteine (GLI3<sup>PHS</sup>), die für das Pallister-Hall-Syndrom im Menschen verantwortlich gemacht werden, liegt etwa in dieser Größenordnung (Biesecker, 1997; Johnston et al., 2005). Vor diesem Hintergrund ergab sich also aus der umfassenden Überschneidung zwischen dem Phänotyp homozygoter *Gli3<sup>Δ699/Δ699</sup>*-Embryonen und dem für PHS beschriebenen Symptomspektrum weitere Unterstützung für die These, dass PHS das Ergebnis über die Maßen gesteigerter GLI3-Repressoraktivität sei. Allerdings muss einschränkend bemerkt werden, dass die Basis der Vergleichbarkeit von GLI3<sup>Δ699</sup> und GLI3R zum damaligen Zeitpunkt lediglich theoretischer Natur war, da das  $GLI3^{\Delta 699}$ -Protein bis dahin noch nicht einmal nachgewiesen worden war. Mittlerweile ist dies in Lysaten von gesamten Embryonen mit Hilfe von Western-Blot-Analysen gelungen (Hill et al., 2007). Der direkte Vergleich mit GLI3R gewährte dabei einen ersten Einblick in die Eigenschaften des GLI3<sup>Δ699</sup>-Proteins. Die im Vergleich zu GLI3R nur wenig kürzere Laufstrecke von GLI3 $^{\Delta 699}$  sprach für einen geringen Unterschied hinsichtlich der molekularen Größen der beiden Proteine. Desweiteren erlaubten diese Untersuchungen eine Gegenüberstellung der Menge von mutanten und wildtypischen Isoformen. Es stellte sich heraus, dass die Menge des  $GLI3^{\Delta 699}$ -Proteins in homozygoten Mutanten der GLI3-Gesamtmenge in wildtypischen Embryonen entspricht (Hill et al., 2007). Somit wurde deutlich, dass sich die Stärke der Expression zwischen mutantem und wildtypischem Gli3-Allel nicht merklich unterscheidet.

Die Untersuchung der physischen Parameter von  $GLI3^{\Delta 699}$  ließ also eine große Übereinstimmung zu der wildtypischen GLI3R-Isoform erkennen. Da dadurch auch eine große Nähe der beiden Proteinformen auf funktioneller Ebene nahegelegt wurde, ergab sich aus diesen ersten  $GLI3^{\Delta 699}$ -Proteinanalysen kein Widerspruch zu der These, dass ein Übermaß an GLI3-Repressor tatsächlich die Ursache des PHS darstellen könnte.

32

#### 1.5 Ziel dieser Arbeit

Das Pallister-Hall-Syndrom (PHS) ist eine autosomal-dominant vererbte, pleiotrope Entwicklungsstörung. Sie wird durch Mutationen im mittleren Drittel des *GLI3*-Gens ausgelöst, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen und so das GLI3-Protein C-terminal verkürzen. Die bisherige Erklärung zur Ursache des PHS beruht darauf, dass das aberrante GLI3<sup>PHS</sup>-Protein einer auch im gesunden Organismus vorkommenden, verkürzten GLI3-Isoform ähnelt, die durch posttranslationale Prozessierung entsteht und als Repressor von Zielgenen des Hedgehog-Signalwegs fungiert. Diese mittlerweile 10 Jahre alte These zur Entstehung von PHS steht allerdings in starkem Gegensatz zu neueren Erkenntnissen aus der Entwicklungsbiologie. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des PHS-Mausmodells, *Gli3<sup>Δ699</sup>*, die Funktion eines PHS-verursachenden GLI3-Proteins untersucht werden, um die molekulare Grundlage des Pallister-Hall-Syndroms besser verstehen zu können. Zusätzlich sollte der allgemeine Beitrag von GLI3 zur Musterbildung in der distalen Gliedmaße, besonders in Bezug auf die Regulation der Zehenzahl und –identität, untersucht werden.

# 2. Material und Methoden

Die während dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Chemikalien wurden, soweit nicht speziell erwähnt, von den Firmen Applichem GmbH, J.T. Baker, Fluka, New England Biolabs (NEB), Merck, Riedel de Haen, Roche Molecular Biochemicals, Roth, PEQLAB Biotechnologie GmbH und Sigma bezogen. Die jeweils benötigten Materialien werden bei den einzelnen Methoden genauer aufgeführt. Zum Ansetzen von Lösungen wurde Wasser aus einer Millipore-MilliQ-Anlage verwendet. Soweit erforderlich wurden die verwendeten Lösungen, Gefäße, Geräte und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121°C und 2 bar für 30 min. oder durch trockene Hitze bei 180°C für 30 min. sterilisiert.

Alle eingesetzten Geräte und Verbrauchsmaterialien, soweit bei den einzelnen Versuchen nicht explizit erwähnt, entsprechen den in einem molekularbiologisch arbeitenden Labor im Allgemeinen verwendeten.

#### 2.1 Tierhaltung

Die Maushaltung und –zucht erfolgte in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die verschiedenen Genmutationen wurden in unterschiedlichen Mausstämmen (s. unten) gehalten. Wenn die Kreuzung zweier Linien für ein Experiment erforderlich wurde, war zur Interpretation der anatomischen Veränderungen oder der molekularen Besonderheiten immer der Vergleich zwischen Wurfgeschwistern ausschlaggebend, um den Einfluss etwaiger Hintergrundeffekte zu minimieren.

Mausstämme:

<i>Gli3<sup>4699</sup>:</i>	C57Bl/6
Gli3 <sup>-</sup> :	(C3HxC57Bl/6)F1 x C57Bl/6
Gli3 <sup>Pdn</sup> :	СЗН
Shh <sup>-</sup> :	СЗН

#### 2.2 Isolierung definierter Embryonalstadien

Zur Verpaarung wurden je 1-2 geschlechtsreife Mäuseweibchen zu einem Männchen in den Käfig gesetzt. Am nächsten bzw. an den folgenden Morgen wurde überprüft, ob die Weibchen einen Vaginalpropf aufwiesen, da dieser als Indikator für eine Paarung während der vorausgegangenen Nacht dient. Im Falle eines vorhandenen Pfropfes wurde 12 Uhr Mittag dieses Tages als Tag 0.5 der Embryonalentwicklung (E0.5) definiert und die Tiere wieder getrennt. Nach Erreichen des gewünschten Embryonalstadiums wurden die Weibchen durch Strecken (zervikale Dislokation) getötet, die Uteri präpariert und die Embryonen sowie die embryonalen Membranen unter dem Stereomikroskop in eiskaltem PBS isoliert. Die Membranen dienten der Ermittlung des individuellen Genotyps der Embryonen (siehe 2.3). Die weitere Behandlung der Embryonen richtete sich nach dem jeweiligen späteren Verwendungszweck (siehe 2.5 und 2.9).

Lösungen:

4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 150 mM NaCl pH 7.3

# **2.3 Identifizierung genetisch veränderter Tiere mittels Polymerase-**Kettenreaktion (PCR)

In den Fällen, in denen der Phänotyp eines Tieres keinen eindeutigen Rückschluss auf seinen Genotyp erlaubte, wurde eine PCR-basierte Genotypisierung an Gewebeproben des Tieres vorgenommen. Für die Identifizierung heterozygot mutanter Mäuse, die zur Zucht benötigt wurden, wurde die DNA aus Schwanzbiopsien juveniler Mäuse gewonnen. Im Falle zu genotypisierender Embronen wurde entweder der Dottersack oder der Kopf des Embryos zur Gewinnung der DNA genutzt. Wenn möglich, ist die Verwendung des Kopfes dabei vorzuziehen, da so die Gefahr der Verschmutzung des Isolats durch maternales Material, z.B. dem Dottersack anheftende Reste des Uterus, verringert wird. Anschließend wurde die DNA in einer PCR-basierten Genotypisierung verwendet.

#### 2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Geweben

#### 2.3.1.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien

PBS

Etwa 1cm Schwanzgewebe juveniler Mäuse wurde mit 700  $\mu$ l Schwanz-Lyse-Puffer und 50  $\mu$ l Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden 250  $\mu$ l gesättigte Kochsalzlösung zugegeben, kurz geschüttelt und 10 min. bei 13.200 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert. Anschließend wurden 750  $\mu$ l des Überstands vorsichtig abgenommen und mit 500  $\mu$ l Isopropanol zur DNA-Präzipitation vermischt. Nach kurzem Schütteln wurden die Proben zwei Minuten bei 13.200 Upm

zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, der Niederschlag mit 500  $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die erhaltene genomische DNA konnte direkt für eine PCR-Reaktion eingesetzt oder bei 4°C gelagert werden.

Lösungen :

Schwanz-Lyse-Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 8 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% (w/v) SDS Proteinase K 10 mg/ml gesättigte Kochsalzlösung (~6M) Isopropanol 70% Ethanol

- Roche #1000144

#### 2.3.1.2 DNA-Isolierung aus embryonalem Gewebe

Die Dottersäcke oder die abgetrennten Köpfe der Embryonen wurde mit je 100 bzw. 200  $\mu$ l Dottersack-Lyse-Puffer und 1 bzw. 2  $\mu$ l Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erfolgreichem Verdau wurde der Ansatz am folgenden Tag mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt und intensiv durchmischt. Bessere Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Proben nach Zugabe von Phenol/Chloroform für 5 min. bei 55°C im Thermomixer auf höchster Stufe geschüttelt wurden (Eppendorf Thermomixer compact). Anschließend wurde zu jedem Ansatz nochmals 200-300  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gegeben, bevor eine 10 minütige Zentrifugation bei 13.200 Umdrehungen pro Minute (Upm) (Eppendorf 5415D) folgte. Die Volumenvergößerung der wässrigen Phase vor der Zentrifugation diente dazu, die Gefahr des Übertrages von organischen Lösungsmittel bei der sich anschließenden Probenentnahme zu verringern. 0,5-1  $\mu$ l des wässrigen, DNA-haltigen Überstandes wurden pro benötigter PCR-Reaktion verwendet; der Rest bis zur erfolgreichen Genotypisierung unter dem Abzug gelagert.

Lösungen :

Dottersack-Lyse-Puffer

Proteinase K Phenol/Chloroform TE 50 mM Tris/HCl, pH 8 1 mM EDTA 100 mM NaCl 1% (w/v) SDS 10 mg/ml 3:1, TE-gesättigt 10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0

- Roche #1000144
# 2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Bezeichnung	Sequenz (5'3')
Gli3_int13_for	GGC CCA AAC ATC TAC CAA CAC ATA
Gli3_int14_rev	CTG GCC ACA CTG AAA GGA AAA GAA
Pdnwt for	GTTCAAGTTGGTGCATAGCTACCAGGT TCC
Pdnwt rev	TGT TTCCCATTGTCCAACCCTACC C
Pdn mut	TTGAGCCTTGATCAGAGTAACTGTC
Tk Mitte for	GAT GCG GCG GTG GTA ATG AC
Tk Mitte rev	TGT GTC TGT CCT CCG GAA GG
XtJ-580-for	TAC CCC AGC AGG AGA CTC AGA TTA G
XtJ-580-rev	AAA CCC GTG GCT CAG GAC AAG
P1	GACCATGTCTGCACACTTAGGTTCC
P2	GAAGGCCAGGAGGAGAAGGCTCAC
Shh1 rev	CGCCCCCTCCTATTTGCTCAG
Neo end for	GCT GAC CGC TTC CTC GTG CTT TAC
Neo-for	CTG TGC TCG ACG TTG TCA CTG
Neo-rev	GAT CCC CTC AGA AGA ACT CGT

# 2.3.2.1 Sequenzen der genutzten Oligonukleotide (Primer)

#### 2.3.2.2 Verwendung der Primerpaare

Nachweis der Existenz von:	verwendetes I	Primerpaar:
<i>Gli3</i> <sup>-</sup> -Allel:	XtJ580 for	– XtJ580 rev
$Gli3^{\Delta 699}$ -Allel:	Tk Mitte for	– Tk Mitte rev
Gli3-wt-Allel (d.h.: weder Gli3 <sup>4699</sup> - noch Gli3 <sup>-</sup> -Allel):	Gli3int13 for	– Gli3int14 rev
<i>Gli3<sup>Pdn</sup></i> -Allel:	Pdn mut	– Pdnwt rev
<i>Gli3</i> -wt-Allel (d.h. kein <i>Gli3<sup>Pdn</sup></i> -Allel):	Pdnwt for	– Pdnwt rev
Shh <sup>-</sup> -Allel:	Neo end for	– Shh1 rev
Shh <sup>+</sup> -Allel:	P1	– P2
Neomycin-Phosphotransferase*:	Neo for	– Neo rev
(*Sequenz enthalten im gentechnisch		

manipulierten Gli3<sup>4699</sup>- und Shh<sup>-</sup>-Locus)

# 2.3.2.3 PCR-Amplifikation

Die PCR-Reaktionen wurden in Maschinen von Eppendorf (Mastercycler Personal und Mastercycler Gradient) und MWG-Biotech (Primus und Primus 96 plus) unter Verwendung von dünnwandigen 0,2 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden auf Eis

angesetzt und als Enzym wurde die *Taq*-Polymerase (aus laboreigener Produktion) eingesetzt. Als Reaktionspuffer diente das ,Green GoTaq'-Puffersystem von Promega (#M7911), das aufgrund seiner Zusammensetzung die Verwendung eines Auftragpuffers für die nach der PCR-Reaktion folgende Gelelektrophorese unnötig machte.

Im Allgemeinen wurde ein 20  $\mu$ l PCR-Ansatz gewählt, in dem jeweils 0,2  $\mu$ l *Taq*-Polymerase (geschätzte 2U), 4  $\mu$ l 5x Reaktionspuffer, 25 pmol dNTP-Gemisch und jeweils 20 pmol der spezifischen Oligonukleotide enthalten waren. Bei Versagen der PCR-Reaktion war oftmals das Verdoppeln des Volumens aller Komponenten (mit Ausnahme der DNA) auf einen 40  $\mu$ l-Ansatz hilfreich.

Standardmäßig wurden folgende Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der DNA-Fragmente gewählt:

#### PCR-Standardansatz:

0,5 µl	DNA			
4 µ1	Green GoTaq®-Reaktions	puffer (5x)		
1 µl	Vorwärts-Primer	Vorwärts-Primer		
1 µl	Rückwärts-Primer			
0,5 µl	dNTP (4mM)			
0,2 µl	Taq-Polymerase			
13,6 µl	dH <sub>2</sub> O			
I ösungen:	pegGOI D dNTP. Set	10 mM dATP	-PEOLAB #20-2010	
Losungen.	peqOOLD divin-set		-1 EQLAD #20-2010	
		TO MINI AUTP		

peqGOLD dNTP-Set	10 mM dATP	-PEQLAB #20-2010
	10 mM dCTP	
	10 mM dGTP	
	10 mM dTTP	
Oligonukleotide	10 pmol/µl in H <sub>2</sub> O	- Sigma-Genosys
H <sub>2</sub> O	autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.	

#### 2.3.2.4 PCR-Programme

Standardbedingungen (	für	alle	Primer	außer	XtJ580	for	und	XtJ58	0 rev):
			a 40 <b>a</b>						

lx	2 min., 94°C
32x	10 sec., 94°C
	30 sec., 57°C
	30 sec., 72°C
1x	7 min., 72°C

Verwendung der Primer XtJ580 for und XtJ580 rev:

1x 2 min., 94°C 35x 30 sec., 94°C 1 min., 62°C 1 min., 72°C 1x 7 min., 72°C

# 2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Molekülen wurde die Methode der Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Das TAE-Puffersystem diente als Gel- und als Laufpuffer. In Abhängigkeit von der Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 1-2 % eingesetzt. Der aufgekochten Agaroselösung wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Zur späteren Größen- und Mengenabschätzung der DNA-Fragmente wurden außerdem die folgenden Lösungen restriktionsenzymatisch gespaltener DNA mit DNA-Auftragspuffer vermischt und als Längenstandard aufgetragen.

#### 1kb-DNA-Leiter:

Lösungen:

12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506; 517; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp (Invitrogen #15615-024)

#### Molecular weight marker VIII:

19; 26; 34; 34; 37; 67; 110; 124; 147; 190; 242; 320; 404; 489; 501; 692; 900; 1114 bp (Roche #11336045001)

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

TAE	40 mM Tris/Acetat	
	2 mM EDTA	
	pH 8.2	
Universal-Agarose	e	-PEQLAB #35-1020
Ethidiumbromid	10 mg/ml	-Applichem #A1152
Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin	
	2% (w/v) Orange G	-Merck #14277
	in TAE	

# 2.5 Whole mount in situ Hybridisierung

Mit dieser Methode können mRNA-Transkripte durch Hybridisierung mit einer Digoxygenin (DIG)-markierten Antisense-RNA-Sonde (siehe 2.6) im fixierten Embryo ("whole mount") nachgewiesen werden. Nach erfolgter Hybridisierung werden die markierten Sonden mittels spezifischer enzymgekoppelter DIG-Antikörper durch Umsetzen eines Farbsubstrates sichtbar gemacht (Holtke et al., 1995).

#### 2.5.1 Vorbehandlung und Hybridisierung

Lösungen:

Im Anschluss an die Präparation (siehe 2.2) wurden die Embryonen über Nacht in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Am folgenden Tag wurden sie für jeweils 10 min. je einmal in PBT, 25% Methanol, 50% Methanol, 70% Methanol und 100% Methanol inkubiert. In 100% Methanol wurden die Embryonen bei -20°C gelagert. Zur Verwendung in der whole mount *in situ* Hybridisierung wurden die Embryonen zunächst durch jeweils 10 minütige Inkubation in 70%, 50%, 25% Methanol rehydriert und in PBT gewaschen. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Proteinase K bei Raumtemperatur, deren Dauer sich nach dem Alter der Embryonen richtete (E10.5: 5 min.; E11.5-12.5: 10 min). Zur Inaktivierung der Proteinase K erfolgte im Anschluss eine 5 minütige Inkubation mit Glycin. Anschließend wurden die Embryonen für 5 min. in PBT gewaschen und dann 20 min. auf Eis in PFA/Glutaraldehyd nachfixiert. Im Anschluß daran wurde nach erneutem kurzen Waschen mit PBT der Hybridisierungsmix zugegeben und die Embryonen bei 65°C für 3-5 Stunden prähybridisierungsmix ausgetauscht, dem die jeweilige RNA-Sonde (~1  $\mu$ g/ml) worden war. Daran schloss sich eine weitere Inkubation bei 65°C über Nacht oder Wochenende an.

DDC		
PBS	4mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	
	$16 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4*2\text{H}_2\text{O}$	
	150 mM NaCl	
	рН 7.3	
	autoklaviert, 121°C, 2bar; 30 min.	
PBT	PBS	
	+1% (v/v) Tween 20	
Paraformaldehyd (PFA)	4% (w/v) in PBS	
Methanol-Reihe	25%, 50%, 70% (v/v) Methanol	
	in PBT	
Proteinase K	5 μg/ml in PBT	
Glycin	2 mg/ml in PBT	
PFA/Glutaraldehyd	4% (w/v) PFA; 0,1% Glutaraldehy	d; in PBS
Hybridisierungsmix	50% Formamid	
	5x SSC; pH 4.5	
	0,1% (v/v) Triton X	
	50 µg/ml Heparin	-Sigma #H9399
	0,5 mg/ml tRNA	-Roche #109525
	5 mM EDTA; pH 8.0	
	in DEPC-H <sub>2</sub> O	

#### 2.5.2 Entfernung unspezifisch gebundener RNA-Sonde und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierung folgten mehrere Lösungswechsel, die unspezifisch gebundene Antisense-RNA auswaschen und die Embryonen in die für die folgenden Schritte benötigten Lösungen überführen sollten. Es wurde zweimal für 30 min. mit Hybridisierungsmix, zweimal für 30 min. mit Lösung I und einmal für 20 min. mit Lösung I/MABT gewaschen. Für diese Schritte wurden die Lösungen auf 65°C vorgewärmt. Im Anschluss wurde zweimal für 10 min. mit MABT bei Raumtemperatur gewaschen, bevor die Embryonen zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung inkubiert wurden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Blockierungslösung durch den AP-gekoppelten anti-DIG Antikörper (1:1000 in Blockierungslösung; Roche #1093274) ersetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Lösungen:	Hybridisierungsmix	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 <sub>2</sub> O			
	Lösung I	50% Formamid			
		1x SSC; pH 4.5			
		0,1% (v/v) Triton X-100			
		in DEPC-H <sub>2</sub> 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			
	Blockierungslösung	2% (w/v) Blockreagenz	-Roche #1096176		
		20% Schafserum – hitzeinaktivier	rt		
		in MABT			

#### 2.5.3 Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper und Färbungsreaktion

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Embryonen 5-7x für je eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C mit MABT gewaschen. Am nächsten Tag folgten bei Raumtemperatur zwei Waschschritte für jeweils 10 min. mit NTMT und schließlich die Inkubation mit Färbelösung im Dunkeln zur Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers. Um eine Überfärbung zu verhindern, musste die Färbereaktion beobachtet und dann durch Waschen in PBT abgestoppt werden. Anschließend wurden die Embryonen bis zur Fotodokumentation der Ergebnisse (siehe 2.10) bei 4°C in PFA gelagert.

Lösungen: MABT 100 mM Maleinsäure, pH 7.5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Triton X

NTMT	100 mM NaCl	
	100 mM Tris/HCl, pH 9.5	
	50 mM MgCl <sub>2</sub>	
	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	
PFA	4% (w/v)	
	in PBS	

# 2.6 RNA-Sondensynthese

#### 2.6.1 Sequenzspezifische enzymatische Spaltung zur Plasmidlinearisierung

Die Plasmid-DNA wurde dem Laborvorrat entnommen (siehe 2.7). Die Restriktionsenzyme wurden zusammen mit ihrem jeweiligen Reaktionspuffer bezogen und den Herstellerangaben (NEB, Roche) entsprechend eingesetzt.

Pro µg DNA wurden 1-10 U Enzym in 1x Enzympuffer verwendet und 1-2 Stunden bei 37° inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot des Restriktionsansatz in der Regel gelelektrophoretisch aufgetrennt und geprüft (siehe 2.4). Mit dem Rest wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.6.2) mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt.

Probe	Restriktionsenzym zur	<b>RNA-Polymerase zur</b>	Referenz/
	Plasmidlinearisierung	in vitro-Transkription	Quelle
Alx-4	BamHI	Т3	Grotewold, L.
dHAND	EcoRI	Τ7	Olson, E. N.
Fgf-8	PstI	Τ7	Martin, G.R.
Gdf-5	SpeI	Τ7	Grotewold, L.
Gli3	NotI	Τ7	Büscher, D
Gremlin	PstI	Т3	Zuniga, A.
Hoxd-12	BamHI	Τ7	Büscher, D.
Hoxd-13	PvuII	Τ7	Duboule, D.
Pax-9	EcoRI	Τ7	Balling, R.
Ptc-1	NcoI	Sp6	Büscher, D.
Shh	HindIII	Т3	McMahon, A.P.
Tbx2	EcoRV	T7	Chapman, D.
Tbx3	PstI	Т3	Chapman, D.

#### 2.6.2 Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung

Die aufzureinigenden Proben wurden zunächst mit Wasser auf 200  $\mu$ l Gesamtvolumen aufgefüllt, um die Gewinnung eines phenolfreien Aliquots nach der Phasentrennung zu erleichtern. Anschließend wurden 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform hinzugefügt, mit der Probe gründlich durchmischt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (5 min., 13000 Upm; Heraeus Biofuge 13). Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die proteinhaltige Interphase sowie die organische Phase wurden verworfen. Zur Präzipitation der DNA wurden 0,1 Volumen Natriumacetat und 3 Volumen Ethanol (abs.) zugegeben und 20 min. bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugieren (10 min., 13000 Upm) sedimentiert, mit 500  $\mu$ l Ethanol (70%) gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde der Niederschlag an der Luft getrocknet und danach in einem angemessenen Volumen TE oder Wasser aufgenommen.

Lösungen:

Lösungen:

Phenol/Chloroform Natriumacetat Ethanol abs. 70% Ethanol TE 3:1; TE gesättigt 3 M; pH 5,2 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0

#### 2.6.3 Synthese von Antisense-RNA-Sonden

Die *in vitro* Transkription fand in einem 20  $\mu$ l Ansatz statt, der sich aus ca. 1  $\mu$ g des zuvor linearisierten Plasmids, 2  $\mu$ l 10x Transkriptionspuffer (Roche #1465384), 2  $\mu$ l 10x DIG-Nukleotid-Mix (Roche #1277073), 1  $\mu$ l RNase Block, 2  $\mu$ l RNA-Polymerase (T3 –Roche #1031163; T7 –Roche #881767, Sp6 –Roche #810274) und DEPC-H<sub>2</sub>O vermischt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden dem Ansatz zur Fällung der RNA 2,5  $\mu$ l LiCl (4 M), 2  $\mu$ l EDTA (0,5 M) und 75  $\mu$ l Ethanol (abs.) zugegeben. Nach Durchmischung und anschließender Inkubation für 30 min. bei -20°C folgte die Zentrifugation (10 min.; 13200 Upm; 4°C; Heraeus Biofuge 13). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen. Zuletzt wurde die RNA kurz auf Eis an der Luft getrocknet und in 40  $\mu$ l 50% Formamid aufgenommen. Ein Aliquot der RNA-Sonde wurde gelelektrophoretisch überprüft, der Rest konnte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung in der whole mount *in situ* Hybridisierung (siehe 2.5) gelagert werden.

DEPC-H2O0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) in H2O<br/>über Nacht gelöst; autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.EDTA0,5 M; pH 8.0LiCl4 MEthanol abs.70% Ethanol50% Formamid50% (v/v) Formamid in DEPC-H2O

# 2.7 Transformation von Plasmiden in Escherichia coli

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden dem Laborvorrat entnommen, der bei Bedarf wieder aufgefüllt wurde. Dazu wurden kompetente Bakterien mit dem zur Neige gehenden Plasmid transformiert. Als bakterieller Wirt wurde der Escherichia coli Stamm JM109 (recA1, lacZΔM15) verwendet. Die Herstellung der kompetenten Zellen durch Laborpersonal erfolgte nach dem Protokoll von Inoue et al., 1990.

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 kodierten Antibiotikaresistenz des verwendeten Plasmids auf antibiotikahaltigen Selektivnährböden ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die herangewachsenen Bakterienkolonien transformierter Zellklone wurden für das Animpfen von Flüssigkulturen (50-100 ml Selektionsmedium) verwendet, um die Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA zu ermöglichen. Nach Inkubation auf einem Plattformschüttler (120Upm) bei 37°C über Nacht wurde die Plasmid-DNA unter Verwendung des "QIAGEN Plasmid Kit" ("Midi" bis 100 µg - QIAGEN GmbH, #12145; "Maxi" bis 500 µg - QIAGEN GmbH, #12163) gemäß dem mitgelieferten Protokoll geerntet. Die an der Luft vollständig getrocknete Plasmid-DNA wurde in einem angemessenen Volumen TE oder H<sub>2</sub>O aufgenommen und die gelöste DNA wurde spektralphotometrisch quantifiziert (siehe 2.7) und zur Überprüfung der DNA-Qualität restriktionsenzymatisch (siehe 2.8.1) und gelelektrophoretisch (siehe 2.4) analysiert und danach dem Laborvorrat zugeführt.

Lösungen :	LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
e		1% (w/v) Trypton	- Applichem #A1553
		0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	- Applichem #A1552
		in H2O	
		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	
	Selektionsmedium 50 µg/m	nl Ampicillin oder	- Applichem #A0839
		25 µg/ml Kanamycin	- Applichem #A1493
		in LB-Medium	
	TE, pH 8,0	10 mM Tris/HCl	
		1 mM EDTA	

#### 2.8 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:

 $dsDNA = 50 \ \mu g/ml$ 

 $RNA = 35 \ \mu g/ml$ 

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 bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten bestimmt werden; gering verunreinigte Proben sollten hierbei Werte von 1,8 bis 2,0 ergeben.

### 2.9 Knochen-Knorpel-Färbung

Zur differentiellen Anfärbung der Knochen und des Knorpels wurden die Extremitäten von Neugeborenen sowie von Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien nach der Präparation für mindestens 24 h in 80% Ethanol fixiert und anschließend sorgfältig gehäutet. Anschließend wurden die Dehydrierung und Entfettung zunächst für 24 h in unverdünntem Ethanol und anschließend für 1-3 Tage in Aceton fortgesetzt. Die Färbung erfolgte über Nacht bei 37°C in Färbelösung. Zur Sichtbarmachung der blaugefärbten knorpeligen und der rotgefärbten verknöcherten Strukturen wurden die Präparate dann zunächst für eine Stunde in Ethanol und anschließend in 1% KOH/20% Glycerin inkubiert, bis die Skelettstrukturen vollständig sichtbar waren. Um diesen Vorgang zu beschleunigen, wurde die Laugenbehandlung bei 37°C und die Lagerung in 100% Glycerin bei Raumtemperatur.

Lösungen :

Essigsäure konz. 80% Ethanol Alizarin Rot S 0,1% (w/v) Alcian Blau 8GX 0,3% (w/v) Färbelösung

Glycerin-Reihe

Alizarin Rot S in 95% Ethanol Alcian Blau in 70% Ethanol 170 ml 70% Ethanol + 10 ml Essigsäure konz. (Eisessig) + 10 ml 0,1% (w/v) Alizarin Rot S + 10 ml 0,3% (w/v) Alcian Blau 20% (v/v) Glycerin in 1% KOH 50%, 80% (v/v) Glycerin in Wasser

-Sigma #A5533 -Sigma #A5268

# 2.10 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation wurde an einem Stereo-Mikroskop (Zeiss Stemi SV11) mittels einer digitalen Kamera (Zeiss AxioCam MR) und dazugehörigem Aufnahmeprogramm (AxioVision AC; Rel.4.5) durchgeführt. Für die anschließende Bildverarbeitung wurde das Programm Photoshop 7.0 verwendet.

# 3. Ergebnisse

# 3.1 Anzahl und Identität der Zehen sind bei Gli3<sup>4699</sup>-Embryonen verändert

Die  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutation hat Auswirkungen auf die Entwicklung der gesamten Gliedmaße (Böse et al., 2002). Im Fokus dieser Arbeit lagen jedoch die Effekte auf die Entwicklung des Autopoden, also des distalsten Teils der Gliedmaßen.

Im direkten äußerlichen Vergleich fiel zunächst die geringere Größe der Pfoten homozygot mutanter Neugeborener ins Auge. Trotz dieser Größenreduktion wiesen die Vordergliedmaßen jedoch meist eine erhöhte Zahl von Zehen, eine sog. Polydaktylie, auf. Die durchschnittliche Länge der Zehen war hingegen auffällig reduziert.

Nach dieser ersten Beurteilung wurden Knochen-Knorpel-Färbungen durchgeführt, die eine Untersuchung des Skeletts ermöglichten. Wie schon äußerlich zu erkennen gewesen war, waren die Vordergliedmaßen der Mutanten überwiegend polydaktyl. Im Regelfall konnten sechs Zehen gezählt werden (6/10), in einem Ausnahmefall sogar sieben (1/10). Zwei der untersuchten Vordergliedmaßen waren oligodaktyl, d.h. die Zahl der Zehen war reduziert und zwar in diesen Fällen auf jeweils vier (2/10). Auch im Hinterbein traten sowohl Poly- als auch Oligodaktylie auf. Im Gegensatz zum Vorderbein war dies aber eher die Ausnahme als die Regel, da acht von zehn Hintergliedmaßen die normale Zahl von fünf Zehen besaßen. Eine Änderung der normalen Zehenzahl war lediglich in zwei Fällen zu verzeichnen gewesen (1x vier und 1x sechs Zehen).

Abgesehen von der genaueren Ermittlung der Zehenzahl erlaubten die Skelettfärbungen vor allem auch die Beurteilung weiterer Parameter, die eine normal entwickelte Gliedmaße auszeichnen. Das Fußskelett einer wildtypischen Maus weist hinsichtlich der Zehenlänge nämlich eine gewisse Asymmetrie auf (Abb. 6A, D). Der anteriorste Zeh ist dabei der kürzeste und besteht, ganz ähnlich dem Daumen der menschlichen Hand, aus nur zwei Knochen, den sog. Phalangen. Im Unterschied dazu setzen sich die vier weiter posterior gelegenen Zehen aus jeweils drei Phalangen zusammen. Dabei erreicht die Zehenlänge ihr Maximum an zentraler Position, dem Zeh #3, um dann wieder abzufallen, so dass Zeh #5 der kürzeste unter den triphalangealen Zehen ist. Allen Zehen ist gemein, dass sie jeweils in der Verlängerung eines Mittelfußknochens liegen. Ebenso wie die Zehen weisen auch die Mittelfußknochen eine entsprechende anteroposteriore Längendifferenz auf (Abb. 6A, D).

Bei den homozygot mutanten Tiere ließ bereits das äußere Erscheinungsbild eine Störung der wildtypischen Ordnung vermuten, da die Zehen insgesamt verkürzt erschienen. Die Untersuchung der Fußskelette offenbarte den Grund für diesen ersten Eindruck.

Durchschnittlich 2-3 der anterior gelegenen Zehen im Vorderfuß und alle Zehen im Hinterfuß bestanden aus nur zwei Phalangen (Abb. 6B, E). Die jeweils zugehörigen Mittelfußknochen waren ebenfalls kürzer als ihre Gegenstücke an vergleichbarer Position in den nicht mutanten Wurfgeschwistern (vgl. Abb. 6A, D mit B, E). Selbst in den oligodaktylen Gliedmaßen war die Zahl der biphalangealen Zehen erhöht (Abb. 6C, F). Außerdem lag in den betreffenden Vordergliedmaßen das Maximum der Zehenlänge nicht an zentraler Position, sondern die Länge nahm von anterior nach posterior kontinuierlich zu (Abb. 6C). Die Silhouette sprach demnach dafür, dass die teilweise auftretende Oligodaktylie auf ein völliges Fehlen der kürzeren posterioren Zehen zurückzuführen war.

Wenn, wie in den polydaktylen Gliedmaßen, posteriore Zehen vorhanden waren, zeigten diese auffällige Fehlbildungen der Skelettelemente. Die posterioren Mittelfußknochen waren in ihrer Morphologie deutlich beeinträchtigt und zwar umso mehr, je posteriorer ihre Position war (vgl. Abb. 6A, D mit B, E). An der posteriorsten Position wurde dies besonders deutlich, da dort häufig zwei Zehen in der Verlängerung eines einzelnen Mittelfußknochen lagen bzw. direkt aus diesem hervorgingen (Abb. 6B, E). Dabei war der posteriorste Zeh oftmals nicht durch eine Gelenkspalte vom Mittelfußknochen getrennt und zeigte als einzige Segmentierung des Knorpelstrahls die Bildung des distalsten Phalangen (Abb. 6B).

In den homozygoten Mutanten beeinflusst  $GLI3^{\Delta 699}$  damit sowohl die Zahl der Zehen als auch ihre Morphologie, die normalerweise spezifisch an die anteroposteriore Position eines Zehs geknüpft ist. Während also in wildtypischen Embryonen nur einer von fünf Zehen anteriore Identität besitzt, weist, basierend auf dem Kriterium der Biphalangie, ein wesentlich größerer Anteil der Zehen von *Gli3<sup>\Delta699\Delta699</sup>*-Embryonen einen anterioren Charakter auf.



Abb. 6 Zahl und Identität der Zehen von Gli3<sup>4699/4699</sup>-Embryonen. Skelettanatomie der Autopoden wildtypischer und mutanter Neugeborener. Dorsale Ansicht von Alcian Blau/Alizarin Rot S gefärbten Vorder- und Hinterpfoten. Blaue Färbung markiert Knorpelmaterial, rote Färbung ist indikativ für bereits verknöchernde Bereiche. Die Autopoden sind so ausgerichtet, dass anterior immer oben ist.

(A, D) Das autopodiale Skelett wildtypischer Embryonen zeichnet sich durch einen einzelnen biphalangealen anterioren Zeh (#1) und vier triphalangeale posteriore Zehen (#2-5) aus. (B) Die Vorderpfoten von  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen waren überwiegend polydaktyl. (C) In einigen Fällen entwickelten  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen eine

Oligodaktylie. (E) Typischerweise besaßen die Hintergliedmaßen von *Gli3<sup>Δ699/Δ699</sup>*-Embryonen 5 Zehen, die alle biphalangeal waren. Jedoch kamen auch Polydaktylie (nicht abgebildet) und Oligodaktylie (F) vor. (B, C, E, F) Besonders zu beachten ist der erhöhte Anteil biphalangealer Zehen in Vorder- und Hinterpfoten der Mutanten.

# **3.2 Der Einfluß unterschiedlicher GLI3-Konzentration auf die verschiedenen Aspekte der Entwicklung der distalen Gliedmaße**

Bereits der Ausfall nur eines *Gli3*-Allels ist ausreichend, um sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen Fehlbildungen der Gliedmaßen hervorzurufen. Dies macht bereits sehr deutlich, dass die Quantität des GLI3-Proteins ein entscheidender Faktor ist. Die Tatsache, dass homozygote *Gli3<sup>-/-</sup>*-Mutanten noch weitaus umfangreichere Veränderungen entwickeln, erweitert diese Sichtweise noch und beweist, dass es mehr als eine einzige kritische Abstufung der GLI3-Menge geben muss (Johnson, 1967). Trotz der offensichtlichen Bedeutung der GLI3-Menge fehlte bisher allerdings eine ausführliche Studie zu den quantitativen Aspekten der GLI3-Funktion.

Um die GLI3-Menge hier über einen möglichst breiten Bereich zu streuen, wurde neben einer *Gli3*-Null-Mutante auch eine weitere *Gli3*-Mutante genutzt, die *Polydactyly Nagoya (Pdn)* heißt (Schimmang et al., 1994; Hayasaka et al., 1980). Frühere Analysen konnten zeigen, dass *Gli3*<sup>Pdn/Pdn</sup>-Embryonen nur 20-30% der Menge an *Gli3*-mRNA produzieren, die in wildtypischen Embryonen gefunden wird (Thien und Rüther, 1999; Ueta et al., 2004).

Der vollständige Verlust der GLI3-Funktion in homozygoten *Gli3*-Null-Mutanten führte zu einer Polydaktylie von 7-8 Zehen (Abb. 7A, G, M). Dabei fehlte die A/P-Asymmetrie eines normalen Fußes, da weder auf der Ebene der Mittelfußknochen noch auf der der Zehen selbst ein deutlicher Längenunterschied zwischen den einzelnen Zehen auszumachen war. Desweiteren war die Bildung der proximalen Phalangen stark beeinträchtigt. An ihrer Stelle enthielt die Region zwischen den scheinbar unbetroffenen Zehenspitzen (Phalanx #3) und den Mittelfußelementen zumeist nur ein unförmiges Knorpelelement (Abb. 7G, M). Diesem Element fehlte die normale Gelenkverbindung zum zugehörigen Mittelfußknochen. Bei vielen der untersuchten *Gli3*<sup>-/-</sup>-Autopoden änderte sich diese Situation zum posterioren Ende hin. Je posteriorer die Position eines Zehs war, desto länger wurde das missgestaltete Knorpelelement. Dies steigerte sich bis zu dem Punkt, dass am posterioren Ende oftmals ein triphalangealer Zeh entstand, dessen Phalangen zwar immer noch nicht die normale Form hatten, aber zumindest in der für diese Position korrekten Anzahl von drei vertreten waren (Abb. 7G, M). Äußerlich sahen die Pfoten der *Gli3<sup>Pdn/-</sup>*-Embryonen (10-15% der normalen *Gli3-mRNA-*Menge) denen von *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen in vielen Aspekten sehr ähnlich. Wie diese zeigten auch *Gli3<sup>Pdn/-</sup>*-Embryonen eine ausgeprägte Polydaktylie und eine halbkreisförmige Silhouette ohne die normale A/P-Asymmetrie (Abb. 7B). Die Skelettfärbungen bestätigten diesen Eindruck und belegten die fehlende Längendifferenz sowohl für die Mittelfußknochen als auch für die Zehen (Abb. 7H, N). In einem auffälligen Unterschied zu *Gli3<sup>-/-</sup>* zeichneten sich *Gli3<sup>Pdn/-</sup>*-Embryonen jedoch durch insgesamt wesentlich besser entwickelte Zehen aus, die sich aus wohl definierten und durch die dazwischen liegenden Gelenkabstände säuberlich voneinander getrennten Phalangen zusammensetzten (Abb. 7H, N).

Auch bei *Gli3<sup>Pdn/Pdn</sup>*-Embryonen (20-30% der normalen *Gli3*-mRNA-Menge) nahm das Ausmaß der Polydaktylie (trotz gesteigerter GLI3-Menge) nicht ab (Abb. 7C, I, O). Allerdings war eine gewisse Annäherung an die normale A/P-Asymmetrie zu verzeichnen. Bereits äußerlich war zu erkennen, dass 1-2 Zehen auf der anterioren Seite deutlich von den anderen abgesetzt waren, die weiterhin eine zusammenhängende Einheit ohne merkliche Längendifferenzen bildeten (Abb. 7C). Im Allgemeinen entwickelten sich an den Vorderbeinen anteriore biphalange Zehen (Abb. 7I). Dennoch war dieser biphalangeale Zeh nicht kürzer als die weiter posterior gelegenen (Abb. 7C, I). Diese Tatsache zeigte deutlich, dass auch in *Gli3<sup>Pdn/Pdn</sup>*-Embryonen der normale anteriore Charakter nicht vollständig etabliert wird.

Im Gegensatz dazu zeigten heterozygote *Gli3*<sup>+/-</sup>-Embryonen (50% der normalen *Gli3*-mRNA-Menge) als einzige Auffälligkeit eine verhältnismäßig milde Polydaktylie in Vorder- und Hinterbeinen (Abb. 7D, J, P). Gelegentlich trat im Vorderbein eine teilweise Verdopplung des Zehs #2 auf (Tab. 1, keine Abbildung). Überzählige oder auch nur teilweise verdoppelte Mittelfußknochen wurden in keinem Fall beobachtet. Außerdem schien die Spezifizierung von anterioren und posterioren Identitäten in diesen Mutanten völlig normal abgelaufen zu sein, denn sie wiesen einen klare A/P-Asymmetrie auf; sowohl in Bezug auf die Zehenlängen als auch hinsichtlich der korrekten Anzahl von Phalangen in den entsprechenden Zehen (Abb. 7D, J, P).

Heterozygote *Gli3<sup>Pdn/+</sup>*-Embryonen (70-80% der normalen *Gli3*-mRNA-Menge) zeichneten sich durch einen weitere Abnahme der auffälligen Veränderungen aus. Auch mit geübtem Auge war lediglich eine extrem milde Polydaktylie in Form einer anterior gelegenen kleinen Vorwölbung zu beobachten, in der nach Skelettfärbungen nur selten eine kleine Knorpelkondensation zu erkennen war (keine Abbildung).

Die Kreuzung der beiden *Gli3*-defizitären Mutanten mit *Gli3*<sup> $\Delta 699$ </sup> brachte einige erstaunliche Erkenntnisse. Bemerkenswerterweise besaßen *Gli3*<sup> $\Delta 699-$ </sup>-Embryonen eine derart ausgeprägte Polydaktylie, dass die Anzahl der Zehen sogar mit der von homozygoten *Gli3*-Nullmutanten vergleichbar war (Abb. 7E, K, Q; Tab. 1). Anders als bei *Gli3*<sup>-/--</sup> schien sich bei*Gli3* $<sup><math>\Delta 699--$ </sup> Embryonen die Entstehung überzähliger Zehen auf die anteriore Seite zu beschränken, denn die posteriore Kontur war identisch mit der wildtypischen Form (Abb. 7E). Das heißt, alle Gliedmaßen der *Gli3*<sup> $\Delta 699--</sup> Embryonen besaßen eine erkennbare anteroposteriore Asymmetrie, die sich auch in den Skelettfärbungen widerspiegelte. Die jeweils zwei anterioren Mittelfußknochen von Vorder- und Hinterbeinen waren signifikant kürzer als die weiter posterior gelegenen (Abb. 7K, Q). Die von diesen kürzeren Mittelfußknochen ausgehenden Zehen bestanden aus zwei Phalangen. Alle weiter posterior gelegenen Zehen waren hingegen triphalangeal und länger als ihre anterioren Gegenstücke (Abb. 7K, Q). Morphologisch waren in$ *Gli3* $<sup><math>\Delta 699--</sup> Embryonen also sowohl eindeutig anteriore als auch normale posteriore Zehenidentitäten vorhanden.</sup>$ </sup></sup>

		-/-	Pdn/-	Pdn/Pdn	+/-	⊿⁄-	ΔΔ
	distal	7,5	7,5	7,6	6,2	8	5,8
Vorder-	MinMax.	6-9	7-8	7-8	5-7	6-9	4-7
bein	Metacarpale	6,5	7,1	7,5	5	6	5
	MinMax.	6-7	7-8	7-8	5	6-7	4-6
	distal	7	7,1	7	6	6,6	5
Hinter-	MinMax.	6-9	6-8	7-8	5-6	6-8	4-6
bein	Metatarsale	5,8	6,2	6	5	6	4,8
	MinMax.	5-7	5-7	6	5	6-7	4-6
Embryonenzahl		9	11	3	19	18	5

Tab.1 Zahlenmäßige Erfassung der proximalen und distalen Zehenelemente in *Gli3*-Mutanten.

Ähnlich wie auch bei  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Embryonen, kam es bei  $Gli3^{\Delta 699/Pdn}$ -Embryonen zu einer Verdopplung des anteriorsten Zehs in Vorder- und Hinterbeinen (Abb. 7F, L, R). Dabei war auch hier eine erfolgreiche Spezifizierung von biphalangealen anterioren und posterioren triphalangealen Zehenidentitäten zu beobachten (Abb. 7L, R). Wohl als Folge der gesteigerten GLI3-Menge war das Ausmaß der Polydaktylie von  $Gli3^{\Delta 699/Pdn}$ -Embryonen jedoch geringer als das von  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Embryonen (Tab.1).

Die hier durchgeführte, direkte Gegenüberstellung hat ergeben, dass die verschiedenen Aspekte der normalen Gliedmaßenentwicklung unterschiedlich sensitiv auf quantitative Schwankungen von GLI3 reagieren. Weiterhin zeigte sich, dass selbst in Abwesenheit von GLI3-FL wohl definierte anteriore und posteriore Zehenidentitäten entstehen können. Dies spricht dafür, dass die unprozessierte GLI3-FL-Isoform für die Festlegung von Zehenidentitäten höchstens eine untergeordnete Rolle spielt.



Abb. 7 Der Einfluss der GLI3-Quantität auf unterschiedliche Parameter der Entwicklung der distalen Gliedmaße. Anterior ist oben und distal ist rechts. Dorsale Ansicht unbehandelter Vorderpfoten (A-F) und Alcian Blau/Alizarin Rot S gefärbter Vorder- und Hinterpfoten (G-R) von E18.5 alten Embryonen. (A, F, K)  $Gli3^{-/-}$ -Embryonen entwickeln 7-8 Zehen, denen die wildtypische A/P-Asymmetrie fehlte. Die Bildung der proximalen Phalangen ist stark beeinträchtigt. Im Allgemeinen ist dieser Defekt umso geringer ausgeprägt, je posteriorer die Position des jeweiligen Zehs ist. (B, H, N) Die Pfoten von  $Gli3^{Pdn/-}$ -Embryonen sind ebenfalls symmetrisch und polydaktyl. Die Skelettfärbung offenbart jedoch eine intakte Segmentierung der Phalangen. In etwa 70% der Fälle ist der anteriore Zeh nicht biphalangeal. (C, I, O) Die polydaktylen Pfoten von  $Gli3^{Pdn/Pdn}$  Embryonen sind asymmetrisch entlang der A/P-Achse. Der anteriorste Zeh der Vorderpfote ist meist biphalangeal, dabei aber abnorm verlängert. (D, J, P) Heterozygote  $Gli3^{+/-}$ -Embryonen zeigen eine normale A/P-Asymmetrie und eine vergleichsweise milde Polydaktylie. (E, K, Q)  $Gli3^{\Delta699/-}$ -Embryonen entwickeln eine stark ausgeprägte Polydaktylie in Verbindung mit einer eindeutig zu identifizierenden anterioren und posterioren und posterioren zehenidentitäten auf, die Polydakytlie war jedoch weniger ausgeprägt als bei  $Gli3^{\Delta699/-}$ -Embryonen.

# 3.3 Die Etablierung der ZPA und die Aktivität der AER sind in den mutanten Gliedmaßenknospen nicht beeinträchtigt

Die zwei wichtigsten Signalzentren der frühen Gliedmaßenentwicklung sind die "apikale ektodermale Leiste" (AER, apical ectodermal ridge) und die "Zone polarisierender Aktivität" (ZPA). ZPA und AER stehen in einem regen, wechselseitigen Informationsaustausch. Sie fördern gegenseitig ihre Existenz und Aktivität im Rahmen eines positiven Regelkreises, den man nach den jeweils sekretierten Faktoren als "SHH/FGF feedback loop" bezeichnet (Niswander et al., 1994). Diese Interaktion ist für das Auswachsen der Gliedmaßenknospe und die Regulation der normalen Zehenzahl unabdingbar (Talamillo et al., 2005). Zu den Faktoren, von denen angenommen wird, dass sie die gegenseitige positive Beeinflussung von ZPA und AER und damit das Wachstum der Gliedmaßenknospe negativ beeinflussen können, zählt vor allem auch GLI3 (Aoto et al., 2002). Am 11. Tag der Embryonalentwicklung (E11.0) wird Gli3 am stärksten in der anterioren und der zentralen distalen Region der Gliedmaßenknospe exprimiert (Abb. 8A). Auch in der Gli3<sup>-/-</sup>-Mutante ist es möglich, die Transkription des mutierten Gli3-Allels sichtbar zu machen, denn das dem Funktionsverlust zugrunde liegende Deletionsereignis entfernte nur die 3' gelegenen, ca. zwei Drittel der Gli3-Gensequenz. Der 5' des Deletionslocus befindliche Teil von Gli3 wird transkribiert. Trotz des Verlustes der GLI3-Funktion ist das Gli3-Expressionmuster in der Gli3<sup>-/-</sup>-Mutante dem wildtypischen bemerkenswert ähnlich (Abb. 8B). Auch die  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutation scheint keinen nennenswerten Einfluss auf die räumliche Ausdehnung der eigenen Expressionsdomäne zu haben, denn auch in dieser Mutante blieb das normale, zu diesem Zeitpunkt in etwa hufeisenförmige Expressionsmuster erhalten (Abb. 8C).

Die Zone polarisierender Aktivität (ZPA) wird durch die Expression von *Shh* gekennzeichnet (Riddle et al., 1993; Abb. 8D). Eine zusätzliche, anteriore Expression von *Shh* ist eine mögliche Ursache für das Auftreten einer Polydaktylie und kommt in vielen der bekannten polydaktylen Mausmutanten vor. Auch die  $Gli3^{-/-}$ -Mutante zeigt eine zusätzliche, anteriore Expression von *Shh*, die in der Hinterbeinknospe besonders gut zu erkennen ist (Abb. 8E). Trotz der beobachteten Polydaktylie der  $Gli3^{-4699/\Delta699}$ -Embryonen war in diesen Mutanten die *Shh*-Expression jedoch unauffällig und zeigte keinen Hinweis auf eine zusätzliche anteriore Expression (Abb. 8F). Eines der Gene, deren Expression von SHH positiv reguliert wird, heißt *Patched (Ptc)* und kodiert für den SHH-Rezeptor. Die Detektion der *Ptc*-Expression dient deshalb allgemein als sensitiver Indikator für die Präsenz von SHH-Signalen (Platt et al., 1997). In wildtypischen Embryonen wird *Ptc* in dem posterioren Bereich der Gliedmaßenknospe exprimiert, der die Quelle des SHH-Signals, die ZPA, umgibt (Abb. 8G).

In Übereinstimmung mit der gezeigten anterioren Expression von *Shh* wurde *Ptc* in *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen auch anterior exprimiert (Abb. 8H). Im Gegensatz dazu war die Expression von *Ptc* in den Gliedmaßenknospen von *Gli3<sup>\Delta 699/\Delta 699</sup>*-Embryonen sichtbar reduziert (Abb. 8I). *Ptc*-Transkripte konnten nämlich im posterioren distalen Mesenchym nicht nachgewiesen werden. Auffällig ist dabei, dass genau in diesem distalen Bereich die Domänen von *Gli3* und *Ptc* im wildtypischen Embryo überlappen. Demzufolge ist an der Stelle, wo im wildtypischen Embryo eine Koexistenz von intensiver *Ptc-* und *Gli3*-Expression vorherrscht, im *Gli3<sup>\Delta 699/\Delta 699</sup>*-Embryo keine *Ptc*-Expression zu detektieren gewesen.

Die Knochen-Knorpel-Färbungen älterer Gli3<sup>4699/4699</sup>-Embryonen zeigten, dass diese verkürzte Zehen mit einer verringerten Anzahl von Phalangen entwickelten. Diese Reduktion der Zehenlänge könnte möglicherweise auf eine Beeinträchtigung des Zehenwachstums aufgrund einer verminderten Aktivität der apikalen ektodermalen Leiste (AER) hindeuten (Sanz-Ezquerro und Tickle, 2003). Genetische Analysen haben gezeigt, dass es sich bei FGF8 (Fibroblast Growth Factor 8) um den wichtigsten Faktor der AER-Aktivität handelt (Lewandoski et al., 2000; Sun et al., 2002). Die AER säumt die distale Spitze der Gliedmaßenknospe nahezu in ihrem vollen Umfang vom anterioren bis zum posterioren Ende. *Fgf*8 wird dabei in der gesamten AER exprimiert (Abb. 8J). In *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen ist die AER und damit auch die Fgf8-Expression nach anterior ausgeweitet (Abb. 8K). In Gli3<sup> $\Delta 699/\Delta 699$ </sup>-Embryonen war die Fgf8-Expression unverändert im Vergleich zu wildtypischen Wurfgeschwistern (Abb. 8L). Da die Möglichkeit besteht, dass geringe Änderungen der Fgf-Expression durch diese Methode nicht aufzulösen sind, wurde die Expression von Gremlin untersucht, die von FGF's positiv reguliert wird. Gremlin wird im posterioren Mesenchym der Gliedmaßenknospe exprimiert (Abb. 8M) und spielt eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung des Regelkreis zwischen AER und ZPA (Khokha et al., 2003). In Gli3<sup>-/-</sup>-Embryonen spiegelt sich die gesteigerte Aktivität der AER in einer Expansion der Gremlin-Domäne wider (Abb. 8N). Im Gegensatz dazu fand sich in Gli3<sup>4699/4699</sup>-Embryonen kein Hinweis auf eine Veränderung des AER/ZPA-Regelkreises, da sich die Gremlin-Expression unverändert zum Wildtyp präsentierte (Abb. 80).

Anders als in  $Gli3^{-/-}$ -Embryonen war also gleichermaßen in wildtypischen wie auch in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen eine Begrenzung der Expression solcher Gene zu erkennen, denen eine Schlüsselrolle in der Förderung des Gliedmaßenwachstums zugesprochen wird. Gemessen an der ursprünglichen Erwartungshaltung, dass das kurze GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup> einem konstitutiv aktiven GLI3-Repressormolekül entsprechen sollte, war es jedoch bemerkenswert,

54

dass das Maß der Herunterregulierung in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen nicht größer war als das in wildtypischen Embryonen.

Demnach ist also auch die zu beobachtende Verkürzung bzw. gehäuft vorkommende Biphalangie der Zehen von  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen nicht einfach auf eine verminderte Aktivität der AER zurückzuführen, sondern muss andere Ursachen haben.



Abb. 8 AER und ZPA sind in Gli3<sup>\[L699/\[L699]-\]</sup> Embryonen intakt. 'Whole-mount in situ'-Hybridisierungen an Tag E11.0-11.5 (A-L) und E10.5 (M-O) in vorderen (A-I) und hinteren Gliedmaßenknospen (J-O). (A-C)Das Expressionsmuster von Gli3 ist weder in Gli3<sup>-/-</sup>noch in Gli3<sup>4699/4699</sup>-Mutanten auffällig verändert. (D-F) Die Shh-Expression wird in Gli3-/-anterior heraufreguliert. In Gli3<sup>4699/4699</sup> ist die Shh-Expression ohne Auffälligkeit im Vergleich zum Wildtyp. (G-I) Wie Shh wird auch Ptc in Gli3<sup>-/-</sup> anterior ektopisch exprimiert. In Gli3<sup>4699/4699</sup>-Mutanten ist Ptc distal herunterreguliert. (J-L) Im Vergleich zum Wildtyp ist die Domäne der Fgf8-Expression in *Gli3<sup>-/-</sup>*-Mutanten nach anterior erweitert. In Gli3<sup>4699/4699</sup>-Embryonen ist die Fgf8-

Expression unverändert. (M-O) Während in *Gli3<sup>-/-</sup>*-Mutanten eine anteriore Expansion der *Gremlin*-Domäne festzustellen ist, zeigte sie sich in *Gli3<sup>4699/4699</sup>* unverändert zum Wildtyp.

## 3.4 Analyse der anteroposterior spezifischen Genexpression

Angesichts der in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen vermehrt auftretenden Merkmale anteriorer Zehenidentität einerseits und der Fehlbildungen der posterioren Zehen andererseits war zu vermuten, dass die anteroposteriore Musterbildung, also die Spezifizierung von anterioren und posterioren Regionen der Gliedmaßenknospe, in diesen Mutanten gestört war. Deshalb wurden im Folgenden solche Genexpressionen untersucht, die in der Literatur mit der Ausbildung bzw. Festlegung der anteroposterioren Polarität in Verbindung gebracht werden. Auf Seiten der anterior-spezifischen Marker zählen dazu unter anderem Alx4 und Pax9. Beide Faktoren sind an der Spezifizierung der anterioren Bereiche des knorpelausbildenden Mesenchyms wesentlich beteiligt (Qu et al., 1997; Peters et al., 1998). Alx4 wird bereits in der frühen Gliedmaßenknospe exprimiert (Abb. 9A), während die *Pax9*-Expression erst ab E11.5 schwach einsetzt und dann ab E12.0-5 stärker wird (Abb. 9D, Neubüser et al., 1995). Dabei wird für die wildtypische Expression von sowohl *Alx4* als auch *Pax9* die Aktivität von GLI3 benötigt (Kuijper et al., 2005; McGlinn et al., 2005). In *Gli3<sup>-/-</sup>*-Mutanten war die Domäne der *Alx4*-Expression deutlich reduziert (Abb. 9B). Im Gegensatz dazu weisen *Gli3<sup>\Delta 699/\Delta 699-\Delta 699-\Delta 699-\Delta 699-\Delta 699-\Delta 699-\Delta 699-\Delta 699-\Delta 699-\Delta 699-Deventeral et al.*(Abb. 9C).</sup>

*Pax9* wird asymmetrisch exprimiert, dass heißt es existiert eine größere anteriore Domäne und eine sehr viel schwächere posteriore Expression (Abb. 9D). Die Abwesenheit von GLI3-Aktivität in  $Gli3^{-/-}$ -Embryonen beeinflusste ausschließlich die anteriore *Pax9*-Expression. Sie wurde derart stark reduziert, dass der in Wildtypen zu beobachtende Intensitätsunterschied zwischen anteriorer und posteriorer *Pax9*-Expressionsdomäne in  $Gli3^{-/-}$ -Mutanten völlig verloren ging (Abb. 9E). In  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen war hingegen ein offensichtlicher anteroposteriorer Intensitätsunterschied zu erkennen, da die anteriore *Pax9*-Expression mindestens auf wildtypischem Niveau existierte bzw. in einigen Fällen die Expressionsdomäne sogar leicht erweitert zu sein schien (vgl. Abb. 9F und Abb. 9D).

Um eine normale anteroposteriore Musterbildung sicherzustellen, muss, neben der Etablierung anterior-spezifischer Expression, auch gewährleistet sein, dass die Expression bestimmter anderer Faktoren anterior unterdrückt wird und auf posteriore Bereiche beschränkt bleibt. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass *Hoxd*-Gene bereits an der sehr frühen Musterbildung (d.h. vor Induktion der *Shh*-Expression in der ZPA) einen bedeutenden Anteil haben (Zakany et al., 2004). Dabei ist für eine normale Entwicklung entscheidend, dass die Expression der *Hoxd*-Gene in der frühen Phase auf das posteriore Mesenchym beschränkt bleibt, um nur dort die Aktivierung der *Shh*-Expression zu erlauben (Zakany et al., 2004). Bei der Beschränkung der *Hoxd*-Expressionsdomänen kommt wiederum GLI3 eine entscheidende Rolle zu (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002). So machte sich der Verlust von GLI3 in einer anterioren Ausdehnung der *Hoxd12*-Expression im distalen Mesenchym der *Gli3*<sup>-/-</sup>. Embryonen bemerkbar (Abb. 9H). Im Gegensatz dazu war die *Hoxd12*-Expression in *Gli3*<sup>4699/4699</sup>-Gliedmaßen deutlich reduziert und ließ so eine Verstärkung der posterioren Restriktion der *Hoxd12*-Expression erkennen (Abb. 9I).

Ein weiterer, in frühen Phasen der Entwicklung ebenfalls für die Induktion der *Shh*-Expression bedeutender Faktor ist dHand (Charité et al., 2000). Nach Etablierung der *Shh*exprimierenden ZPA wird dann die *dHand*-Expression durch SHH gefördert, während GLI3 einer anterioren Expression von dHAND entgegenwirkt (Fernandez-Teran et al., 2000; te Welscher et al., 2002). Am Tag E11.5 wird *dHand* im posterioren und distalen Mesenchym der wildtypischen Gliedmaßenknospe exprimiert (Abb. 9J). In  $Gli3^{-/-}$ -Mutanten dehnt sich die *dHand*-Domäne bis zum anterioren Ende der Knospe aus (Abb. 9K). Wiederum zeigte sich das entgegengesetzte Bild in den  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Mutanten: Die Expression von *dHand* war im Vergleich zum Wildtyp deutlich schwächer und weniger nach anterior und distal ausgedehnt (Abb. 9L).

Zusammengefasst zeigen diese Analysen in Übereinstimmung mit den Literaturdaten, dass der anteriore Charakter des Mesenchyms ohne die Funktion von GLI3 weitgehend verloren geht bzw. nur noch stark eingeschränkt vorhanden ist. In  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Mutanten hingegen ist sowohl die Etablierung der anterior-spezifischen Genexpression als auch die Restriktion der posterioren Gene zu beobachten. Dies entspricht prinzipiell den Musterbildungsvorgängen, die auch in wildtypischen Embryonen zu finden sind. Dabei ist allerdings bemerkenswert, dass sich die normale Balance zwischen anterioren und posterioren Faktoren in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Mutanten zugunsten der anterioren Einflüsse verschiebt. Im Ergebnis ist dadurch die Region, die frei von posterior-spezifischer Genexpression ist, deutlich größer als in wildtypischen Embryonen.



Abb. 9 Markergen-Expression der A/P-Musterbildung. 'Whole-mount in situ'-Hybridisierungen der vorderen Gliedmaßenknospen an Tag E10.5 (A-C, G-H); E11.5 (J-L) und E12.5 (D-F). (A-C) In Gli3<sup>-/-</sup>-Embryonen ist Alx4-Expression die drastisch reduziert, *Gli3<sup>4699/4699</sup>*-Mutanten wohingegen Alx4 in normal exprimiert wird. (D-F). Die anteriore *Pax9*-Expression ist in  $Gli3^{-/-}$  stark reduziert, während die anteriore Pax9-Expression von *Gli3<sup>4699/4699</sup>*-Mutanten in ihrer Intensität mindestens der der wildtypischen entspricht. (G-I) Im Wildtyp ist die Hoxd12-Expression auf die posteriore Hälfte der Gliedmaßenknospe

beschränkt. Im Vergleich dazu, ist die *Hoxd12*-Domäne in  $Gli3^{-/-}$ -Embryonen nach anterior erweitert, während sie sich in  $Gli3^{\Delta 69\%\Delta 699}$ -Mutanten verkleinert darstellt. (J-L) Die Expression von *dHand* war in den Gliedmaßenknospen von  $Gli3^{-/-}$ -Embryonen bis in die anterioren Regionen ausgedehnt. In  $Gli3^{\Delta 69\%\Delta 699}$ -Mutanten war die posteriore Restriktion von *dHand* stärker als im Wildtyp.

#### 3.5 Analyse der molekularen Zehenidentitäten

Die Hoxd-Gene spielen nicht nur in der frühen Phase der Gliedmaßenentwicklung eine wichtige Rolle (Zakany et al., 2004). Zu späteren Zeitpunkten (E12.5) ist die Knospe in Regionen mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Hoxd-Expression aufgeteilt, so dass daran die Trennung von anteriorer und posterioren Zehenidentitäten zu erkennen ist (Chiang et al., 2001). In diesem Zusammenhang sind besonders *Hoxd12* und *Hoxd13* zu nennen. Beide werden im sich entwickelnden Autopoden exprimiert und beeinflussen in einer dosisabhängigen Weise die Ausbildung und das Wachstum der Zehenkondensationen (Zakany et al., 1997; Zakany und Duboule, 1999). Am Tag E12.5 ist die Region, die später den Zeh #1 ausbilden wird, dadurch gekennzeichnet, dass dort zwar Hoxd13 aber nicht Hoxd12 exprimiert wird (Chiang et al., 2001). So zeigten denn auch am Tag E12.5 alle drei Genotypen übereinstimmend Hoxd13-Expression in allen Zehenkondensationen (Abb. 10A, B, C). Im Gegensatz dazu war die Hoxd12-Expression in wildtypischen Embryonen nur in den vier posterioren Zehenkondensationen vorhanden (Abb. 10D). In Gli3<sup>-/-</sup>-Mutanten fand sich eine derartige Beschränkung der Hoxd12-Expression nicht; sie exprimierten Hoxd12 in allen Zehenkondensationen (Abb. 10E). Ganz anders war dies in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen. Dort war wie im Wildtyp eine Repression von Hoxd12 im anterioren Mesenchym zu verzeichnen, allerdings in einem solchen Umfang, dass eine durchgehende Hoxd12-Expression nur in den drei posteriorsten Zehenkondensationen zu finden war (Abb. 10F). Damit war der Bereich, der frei von Hoxd12-Expression war, deutlich größer als bei wildtypischen Wurfgeschwistern (vgl. Abb. 10F mit Abb. 10D).

Abgesehen von zusätzlichen Zehen von augenscheinlich anteriorster Identität war an den Skelettfärbungen der  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen auffällig gewesen, dass die posterioren Zehen untereinander verwachsen und missgestaltet waren (Abb. 1B, E). Bei der Suche nach Faktoren, die zur Spezifizierung der posterioren Zehenidentitäten beitragen könnten, sind in letzter Zeit vor allem die Gene *Tbx2* und *Tbx3* in den Fokus geraten. Es konnte gezeigt werden, dass TBX2 und TBX3 sowohl für die Existenz als auch für die Identitätsspezifizierung der posterioren Zehen von entscheidender Bedeutung sind (Bamshad et al., 1997; Tümpel et al., 2002; Suzuki et al., 2004).

In der wildtypischen Gliedmaßenknospe wird *Tbx2* am Tag E11.5 von der Region des zukünftigen Zehs #5 bis in die Region des zukünftigen Zehs #4 exprimiert (Abb. 10G). Die Expression in GLI3-defizitären Gliedmaßenknospen zeigte keine auffälligen Abweichungen von diesem normalen Bild (Abb. 10H). In *Gli3*<sup> $\Delta 699/\Delta 699$ </sup>-Embryonen war die Expression von *Tbx2* jedoch so stark eingeschränkt, dass sich *Tbx2*-Transkripte in der Region des zukünftigen

Zehs #4 überhaupt nicht und in der Region des zukünftigen Zehs #5 nur reduziert nachweisen ließen (Abb. 10I).

Anders als das im Autopoden nur posterior exprimierte *Tbx2*, wird *Tbx3* sowohl in einer anterioren als auch in einer posterioren Domäne exprimiert (Abb. 10J). In *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen kam es zu einem Verlust der anterioren *Tbx3*-Expression, während die posteriore Expressionsdomäne in ihrer Ausdehnung weitgehend unverändert blieb (Abb. 10K). Das genau gegensätzliche Bild präsentierte sich in den Gliedmaßenknospen von *Gli3<sup>Δ699/Δ699</sup>*-Embryonen. Während die anteriore *Tbx3*-Domäne der im Wildtyp glich, war die posteriore Expression von *Tbx3* drastisch reduziert (Abb. 10L).

Die Ergebnisse der molekularen Analysen an den  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen stimmen also mit den phänotypischen Eindrücken der Gliedmaßenanatomie überein. Das ausschließliche Vorkommen von GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup> fördert die Ausbildung der anterioren Identität und interferiert gleichzeitig mit der Ausbildung posteriorer Zehenidentitäten.



Abb. 10 Analyse des Musters der **Markergen-Expression** für Zehenidentitäten. 'Whole-mount in situ' Hybridisierungen von vorderen Gliedmaßenknospen an Tag E12.5 (A-F) und E11.5 (G-L). (A-C) In allen Zehenkondensationen aller drei Genotypen Hoxd13-Expression ist nachzuweisen. (D-F) Die Domäne der Hoxd12-Expression ist in *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen bis in die anteriorste Zehenkondensation expandiert. Bei Gli3<sup>2699/2699</sup>-Mutanten umfasst die anteriore Region, in der keine Hoxd12-Expression nachzuweisen ist, mehr als eine Zehenkondensation und ist damit größer als im

Wildtyp. (G-L) Die posteriore Expression von *Tbx2* und *Tbx3* ist in  $Gli3^{-/-}$  weitgehend unauffällig. Im Unterschied zum Wildtyp ist im Autopoden von  $Gli3^{-/-}$ -Embryonen jedoch keine anteriore *Tbx3*-Domäne zu sehen. In  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Mutanten ist im anterioren Teil des Autopoden keine Veränderung der Expression von *Tbx2* oder *Tbx3* im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen, jedoch ist die posteriore Expression sowohl von *Tbx2* als auch von *Tbx3* reduziert.

# 3.6 Die Zehenentwicklung von *Gli3<sup>4699</sup>*-Mutanten in Abwesenheit von SHH

Der Verlust der SHH-Funktion bei Mäusen resultiert in schwer missgebildeten Gliedmaßen, die vorne nur Rudimente von Zehen und hinten einen einzelnen, biphalangealen Zeh tragen (Chiang et al., 2001; Sagai et al., 2005). Wenn der Verlust von SHH allerdings von einem Verlust von GLI3 begleitet wird, so kommt es in den betroffenen kombiniert homozygoten Embryonen zur Ausbildung polydaktyler Gliedmaßen, die in ihrem Phänotyp nicht von *Gli3<sup>-/-</sup>*-Mutanten zu unterscheiden sind (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al. 2002). Dies Ergebnis impliziert, dass die Wirkung von SHH in der Gliedmaßenknospe an die Anwesenheit von GLI3 gebunden ist.

Da die Gli3<sup>4699</sup>-Mutante eine Situation repräsentiert, in der SHH auf der Ebene der GLI3-Prozessierung keinen Einfluss nehmen kann, war es wichtig herauszufinden, ob ein zusätzlicher Verlust von SHH den Phänotyp von Gli3<sup>4699</sup>-Mutanten verändern würde. Die erste Auffälligkeit der kombiniert homozygoten Embryonen war, dass sie spätestens zwischen Tag 11.5 und 12.5 der Embryonalentwicklung starben. Dies trifft auf keine der beiden Einzelmutanten zu, von denen man jeweils auch wesentlich fortgeschrittenere Entwicklungsstadien isolieren kann. Ein genauer Vergleich der Skelettanatomie zwischen kombiniert homozygoten Embryonen und Einzelmutanten den war deshalb bedauerlicherweise nicht möglich. Allerdings lässt die Größe einer Gliedmaßenknospe an Tag E12.5 eine relativ zuverlässige Vorhersage der später daraus hervorgehenden Zehenzahl zu. Deshalb wurde die Form und Größe der Gliedmaßenknospen von  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ ; Shh<sup>-/-</sup> und  $Gli3^{\Delta 699/-}$ ; Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen an Tag E12.5 als Maß für die Anzahl der darin verborgenen Zehenanlagen herangezogen. Den Maßstab für diese Extrapolation bildeten die jeweiligen Größen der Knospen von wildtypischen und verschiedenen mutanten Gliedmaßen, deren tatsächliche Zehenzahl bekannt war. Angesichts der bekannten Fakten, dass nämlich Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen höchstens einen Zeh, Gli3<sup>+/-</sup>; Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen etwa drei, wildtypische fünf und  $Gli3^{-/-}$ ;  $Shh^{-/-}$  sowie  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Embryonen sieben bis acht Zehen hervorbringen (Abb. 11A-D; Litingtung et al., 2002), stand ein breites Spektrum an Vergleichsgrößen zur Verfügung, um die Abschätzung der fraglichen Gliedmaßenknospen auf eine zuverlässig breite Basis zu stellen. Darauf basierend sagten die Gliedmaßenknospen von Gli3<sup>4699/4699</sup>; Shh<sup>-/-</sup>- und  $Gli3^{\Delta 69\%}$ ; Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen vier bis fünf bzw. sechs bis sieben Zehenanlagen voraus (Abb. 11E, F). Damit war klar, dass diese kombiniert mutanten Embryonen in ihrer Zehenzahl den jeweiligen  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutanten ( $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$  bzw.  $Gli3^{\Delta 699/-}$ ) sehr nahe kamen und sich damit deutlich von dem nahezu zehenlosen Phänotyp der Shh<sup>-/-</sup>-Einzelmutanten unterschieden.



Abb. 11 Vergleich der Gliedmaßengröße und -form verschiedener Kombinationen von *Gli3*- und *Shh*-Mutationen. Der Habitus und die dorsale Sicht der vorderen und hinteren Gliedmaßenknospen an Tag E12.5 sind in allen Fällen im gleichen Maßstab abgebildet (A-F). (A) Wildtypischer Embryo und seine Gliedmaßenknospen; die fünf Zehenkondensationen treten bereits deutlich hervor. (B) *Shh*-Mutanten zeichnen sich durch einen fast vollständigen Verlust der autopodialen Strukturen aus, was bereits in diesem frühen Stadium an der Größenreduktion der distalen Gliedmaßenknospe zu sehen ist (C) Die Form der Gliedmaßenknospen von *Gli3<sup>-/-</sup>; Shh<sup>-/-</sup>*-Embryonen spricht für eine Verbreiterung und damit für zusätzliche Zehenanlagen. (D) *Gli3<sup>4699/-</sup>*-Embryonen lassen bereits die anteriore Polydaktylie erkennen. (E) Die Form der Knospen von *Gli3<sup>4699/-</sup>; Shh<sup>-/-</sup>*-Embryonen spricht für die Existenz von überzähligen Zehenanlagen. (F) Bei *Gli3<sup>4699/69</sup>; Shh<sup>-/-</sup>*-Embryonen war die vordere Knospe kleiner und die hintere in etwa gleich groß wie das jeweilige wildtypische Gegenstück.

Glücklicherweise ließ sich die Voraussage der Zehenzahl zumindest für *Gli3*<sup>4699/-</sup>; *Shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen im Nachhinein überprüfen, denn für diesen Genotyp konnten einige Embryonen weiter fortgeschrittener Entwicklungsstadien gewonnen werden. Zu diesen späteren Zeitpunkten treten die einzelnen Zehenanlagen schon eindeutig hervor, so dass eine direkte Bestandsaufnahme der Zehenzahl und sogar der Zehenidentitäten möglich wird.

Die Gliedmaßen von E14.5-Embryonen machten klar, dass  $Gli3^{\Delta 699'-}$ ;  $Shh^{--}$ -Embryonen deutlich mehr Zehenanlagen entwickelten als  $Gli3^{+-}$ ;  $Shh^{--}$ -Embryonen oder auch wildtypische Embryonen (Abb. 12A, B, D). Tatsächlich besaßen die  $Gli3^{\Delta 699'-}$ ;  $Shh^{--}$ -

Embryonen ebenso wie ihre  $Gli3^{\Delta 699-}$ -Wurfgeschwister 7-8 Zehenanlagen (Abb. 12C, D). Das zeigte, dass die Abschätzung der Zehenzahl auf Basis der Gliedmaßengröße zutreffende Voraussagen erlaubt hatte. Über die Ermittlung der reinen Anzahl hinaus ermöglichten die Knorpel-Färbungen der Embryonen auch eine erste Beurteilung der Zehenidentitäten (Abb. 12E-H). Zu diesem Entwicklungszeitpunkt zeigen die proximalen Phalangen der wildtypischen Embryonen bereits eine recht fortgeschrittene Verknorpelung (Chondrogenese); in der Knorpelfärbung werden sie intensiv blau gefärbt (Abb. 12E). Die Chondrogenese des distalen Phalanx ist weniger weit fortgeschritten, er wird lediglich schwach eingefärbt (Abb. 12E). Das bedeutet, dass Zehenanlagen anteriorer Identität in diesem Entwicklungsstand (E14.5) nur einen intensiv gefärbten Phalanx besitzen. Auf dieser Basis war zu diesem relativ frühen Zeitpunkt bereits zu erkennen, dass  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Embryonen sowohl anteriore als auch posteriore Zehenidentitäten ausbildeten (Abb. 12H). Das Verknorpelungsmuster der  $Gli3^{\Delta 699/-}$ ;  $Shh^{-/-}$ -Embryonen war interessanterweise nahezu deckungsgleich mit dem von  $Gli3^{\Delta 69\%}$ -Embryonen (vgl. Abb. 12G und H). Es ist also davon auszugehen, dass diese beiden Mutanten nicht nur auf Ebene der Zehenzahl, sondern auch bezüglich der Verteilung der Zehenidentitäten weitgehend identisch sind.



Abb. 12 Die frühe Skelettanatomie verschiedener Kombinationen von *Gli3*- und *Shh*-Mutationen. Dorsale Ansicht unbehandelter (A-D) und Alcian Blau/Alizarin Rot S gefärbter (E-H) Vorderpfoten an Tag E14.5. (A, E) Der wildtypische Embryo zeigt bereits fünf eindeutig separierte Zehen. Die distalen Phalangen lassen sich zu diesem Entwicklungszeitpunkt nur gering färben, da die Knorpelbildung dort noch nicht weit fortgeschritten ist. (B, F) Die Kombination  $Gli3^{+/-}$ ;  $Shh^{-/-}$ -bringt oligodaktyle Gliedmaßen mit 3-4 Zehen hervor, die merklich kürzer sind als die des Wildtyps. (C, G und D, H) Zwischen dem Phänotyp von  $Gli3^{\Delta 699'-}$ - und dem von  $Gli3^{\Delta 699'-}$ ;  $Shh^{-/-}$ -Embryonen bestehen deutliche Parallelen: Die Zahl der Zehen und auch das Muster der Knorpelfärbung als Indikator der Zehenidentität sind nahezu deckungsgleich.

Da die Färbungsintensität der Phalangen jedoch ein relativ unscharfes Kriterium zur Interpretation der Phalangenzahl und damit der Zehenidentität darstellte, war es von großem Vorteil, dass zumindest ein  $Gli3^{\Delta 69\%-}$ ;  $Shh^{-/-}$ -Embryo an Tag E15.5 erhalten werden konnte. Durch die Detektion der Gdf5-Expression ist es zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits möglich, die Zahl der Phalangen eindeutig zu ermitteln, denn das Muster der Gdf5-Expression deckt sich ab etwa E15.5 mit allen Orten der interphalangealen Gelenkbildung im Autopoden (Storm und Kingsley, 1996).

Folgerichtig zeigte sich in der anteriorsten Zehenanlage der wildtypischen Embryonen lediglich ein Streifen interphalangealer *Gdf5*-Expression, während die vier posterioren Zehenanlagen jeweils zwei streifenförmige *Gdf5*-Expressionsdomänen aufwiesen (Abb. 13A, [IP]). Dazu ist zu bemerken, dass der jeweils proximalste Streifen der *Gdf5*-Expression keine Grenze zwischen Phalangen darstellt. Vielmehr markiert er den Ort des sog. Metacarpophalangealgelenks, das zwischen Mittelfußknochen und proximalstem Phalanx entsteht (Abb. 13A, [M]).



Abb. 13 Phalangensegmentierung verschiedener Kombinationen von Gli3- und Shh-Mutationen an Tag E15.5. Analyse der Gdf5-Expression an Tag E15.5 mittels 'Whole-mount in situ' Hybridisierung. Zur Verbesserung der Farbintensität wurden die Gliedmaßen teilweise gehäutet. Im Zuge dessen ist im wildtypischen und im *Gli3<sup>4699/-</sup>*-Embryo jeweils eine Zehenkuppe abgetrennt worden (\*). Das *Gdf*5-Bandenmuster blieb davon jedoch unberührt. (A) In der wildtypischen Situation markieren die streifenförmigen Gdf5-Domänen von proximal nach distal gesehen zunächst das metacarpophalangeale Gelenk (M). Distal davon folgen weitere streifenförmige Gdf5-Domänen, die die interphalangeale Segmentierung [IP] anzeigen. Bei anteriorer Zehenidentität entsteht eine, bei posteriorer Identität zwei interphalangeale Gdf5-Domänen. (B) In Gli3<sup>-/-</sup> Embryonen ist zu beobachten, dass die metacarpophalangeale Gdf5-Domäne vor allem in der anterioren Hälfte extrem ausgedehnt ist [M\*]. Außerdem ist in der zentralen Zehenanlage eine sich zwischen der metacarpo- und der einzelnen interphalangealen Gdf5-Expression ausbildende, weitere Gdf5-Domäne zu erkennen [P\*]. In der posterioren Hälfte der Gliedmaße von Gli3<sup>-/-</sup>-Embryonen sind zwei vollständige interphalangeale Gdf5-Domäne vorhanden. (C) Das Gdf5-Expressionsmuster in  $Gli3^{\Delta 69\%-}$ -Embryonen zeigt zwei anteriore Zehenanlagen je einer IP-Domäne und vier posteriore Zehenanlagen mit je zwei IP-Domänen. (D) Entsprechendes trifft auch auf Gli3<sup>4699/-</sup>; Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen zu, bei denen das Muster der Gdf5-Expression ebenfalls dafür spricht, dass zwei Zehenanlagen mit anteriorer und vier Zehenanlagen posteriorer Identität entstanden sind.

Der Verlust von GLI3 in Gli3<sup>-/-</sup>-Embryonen machte sich in einem veränderten Muster der *Gdf5*-Expression bemerkbar. Dabei zeigten sich deutlich unterschiedliche Effekte entlang der anteroposterioren Achse. In den Zehenanlagen der anterioren Hälfte war die proximalste Gdf5-Domäne extrem erweitert (Abb. 13B, [M\*]). Außerdem bildete sich in diesen Zehenanlagen nur eine einzelne interphalangeale Gdf5-Expressionsdomäne aus (Abb. 13B). In der zentralen Zehenanlage änderte sich dieses Bild etwas. Zum einen war die Erweiterung der metacarpophalangealen Gdf5-Expression weniger ausgeprägt. Außerdem war der Ansatz einer zweiten interphalangealen Gdf5-Expression zu erkennen, die sich zwischen dem metacarpophalangealen und dem interphalangealen Streifen ausbildete (Abb. 13B, [IP\*]). Die Positionierung dieser ,neuen' Gdf5-Domäne machte deutlich, dass es sich hierbei um die (allerdings offenbar nur teilweise erfolgreiche) Segmentierung der proximalen Phalangen handelte. In den Zehenanlagen der posterioren Hälfte reduzierte sich die Verbreiterung der metacarpophalangealen Gdf5-Expression noch weiter und die proximale interphalangeale Domäne etablierte sich vollends (Abb. 13B). Da das Muster der Gdf5-Expression als Indikator für Orte der Gelenkentwicklung, also für Knorpel- und Knochen-freie Bereiche zwischen Skelettelementen dienen kann, zeichneten sich anhand des veränderten Musters der *Gdf5*-Expression bereits die Fehlbildungen des autopodialen Skeletts von *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen späterer Entwicklungsstände ab (vgl. Abb. 7G und Abb. 13B). Denn in gleicher Weise wie die metacarpophalangeale Domäne der Gdf5-Expression anterior stärker erweitert war als posterior, war auch die in den Skelettfärbungen zu beobachtende Lücke zwischen Mittelfußknochen und proximalstem Phalanx anterior größer als posterior (vgl. Abb. 7G und Abb. 13B). Eine weitere Übereinstimmung zwischen Gdf5-Expressionsmuster und den Ergebnissen der Knochen-Knorpel-Färbungen bestand darin, dass sich in den Zehen der posterioren Hälfte sowohl die proximale interphalangeale Gdf5-Expression als auch die Bildung der entsprechenden Phalangen normalisierte.

In  $Gli3^{\Delta 699'-}$ -Embryonen kam es zu keiner solchen Gdf5-Deregulierung. Zwei anteriore Zehenanlagen besaßen jeweils eine interphalangeale Gdf5-Domäne, während die vier posterioren Zehenanlagen jeweils zwei Domänen aufwiesen (Abb. 13C). Außerdem war sowohl in der Zehenanlage #1 als auch in Zehenanlage #3 eine Verdopplung des distalsten Phalanx zu erkennen. Damit präsentierte sich das aufgrund der Knochen-Knorpel-Färbung zu erwartende Bild (vgl. Abb. 7K und Abb. 13C). Die Untersuchung des  $Gli3^{\Delta 699'-}$ ;  $Shh^{-/-}$ -Embryos ergab ebenfalls, dass zwei anteriore Zehenanlagen nur jeweils einen Streifen und die vier daran anschließenden posterioren Zehenanlagen jeweils zwei Streifen von Gdf5Expression besaßen (Abb. 13D). Das bedeutete, dass anterior zwei biphalangeale Zehen entstehen würden, während die übrigen posterioren Zehenanlagen triphalangeal wären.

Durch die Untersuchung der *Gdf5*-Expression wurde also der Eindruck bestätigt, den bereits die Knochen-Knorpel-Färbungen der E14.5 Embryonen vermittelt hatten. Beide Analysen sprechen übereinstimmend dafür, dass sich der Gliedmaßenphänotyp der kombiniert mutanten  $Gli3^{\Delta 699/-}$ ; *Shh<sup>-/-</sup>*-Embryonen nicht wesentlich von dem der  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Embryonen unterscheidet. Dies gilt sowohl für die Zahl, als auch für die Identität der Zehen. Dementsprechend muss davon ausgegangen werden, dass SHH weder für die Ausbildung der Polydaktylie von  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Embryonen eine notwendige Rolle spielt.

# 4. Diskussion

# 4.1 Quantitative Aspekte der Aktivität von GLI3 bzw. GLI3<sup>4699</sup>

Die grundsätzliche Bedeutung von GLI3 für die Gliedmaßenentwicklung ist bereits Gegenstand zahlreicher Publikationen gewesen. Das von diesen Analysen gezeichnete Bild machte deutlich, dass GLI3 einen entscheidenden Beitrag zu den verschiedensten Aspekten der Gliedmaßenentwicklung leistet. Dazu zählt die Regulation der Knospengröße, die mit der späteren Zehenzahl korreliert, die Festlegung der unterschiedlichen Zehenidentitäten und auch das ,Timing' der Chondrogenese, also der Kondensation und Verknorpelung der späteren Skelettelemente (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002B; Ahn and Joyner, 2004; McGlinn et al., 2005). Angesichts der Fülle an vorliegenden Untersuchungen überrascht es jedoch, dass bisher keine Studie umfassend untersucht hat, welche quantitativen Anforderungen die Ausprägung der verschiedenen Merkmale der Gliedmaßenentwicklung an die GLI3-Menge stellt. Es gab also bisher keine Möglichkeit vorherzusagen, in welchem Umfang eine Reduktion der GLI3-Menge im Rahmen der einzelnen Parameter entweder noch toleriert werden oder schon zu merklichen Störungen der Anatomie führen würde. Da sich im Laufe der Arbeit zeigte, dass die Menge des in der Gliedmaßenknospe vorliegenden GLI3<sup>Δ699</sup> von großer Bedeutung war, wurde dies zum Anlass genommen, auch die quantitativen Einflüsse von GLI3 insgesamt zu untersuchen und sich so der oben geschilderten Lücke in der bisherigen Darstellung von GLI3 anzunehmen. Außerdem wurde die Gli3<sup>4699</sup>-Mutante dazu verwendet, Aufschluss über den jeweiligen Anteil der beiden wildtypischen GLI3-Isoformen, GLI3R und GLI3-FL, an der Festlegung der A/P-Asymmetrie zu gewinnen.

#### 4.1.1 Die Regulation der Zehenzahl

Die zu Beginn der Arbeit vorliegenden Publikationen zur Bedeutung von GLI3 für die Gliedmaßenentwicklung enthielten bereits deutliche Hinweise darauf, dass eine Veränderung der GLI3-Menge, wie z.B. in den heterozygoten *Gli3<sup>+/-</sup>*-Tieren, die Anzahl der entstehenden Zehen beeinflusst. Es war also davon auszugehen, dass die Wirkung von GLI3 auch an die in der Gliedmaßenknospe befindliche GLI3-Proteinmenge gekoppelt sein würde. Im Fall der Regulation der Zehenzahl durch GLI3 war dahingehend bekannt, dass eine höhere Menge an GLI3 die Zahl der Zehen stärker reprimiert als eine geringere Menge (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al.; 2002). Die hier vorgestellten Untersuchungen bestätigten diesen Zusammenhang grundsätzlich, konnten aber darüber hinaus einen bisher noch nicht

beschriebenen Bezug zwischen GLI3-Menge und Zehenzahl herstellen. Denn überraschenderweise war von  $Gli3^{-/-}$  über  $Gli3^{Pdn/-}$  bis hin zu  $Gli3^{Pdn/Pdn}$ -Embryonen keine Abnahme der Polydaktylie zu verzeichnen, obwohl dies einer deutlichen Steigerung der GLI3-Menge von 0% auf ca. 40% der wildtypischen Menge entsprach. Erst eine weitere Erhöhung im Schritt von  $Gli3^{Pdn/Pdn}$ - zu  $Gli3^{+/-}$ -Embryonen erbrachte einen erheblichen Rückgang der Zahl zusätzlicher Zehen. Die Beziehung von Zehenzahl zur GLI3-Menge scheint also derart zu sein, dass von einem bislang noch nicht beschriebenen, Schwellenwertartigen Mechanismus ausgegangen werden muss. Ganz offenbar ist ein Mindestmaß an GLI3 erforderlich, um die Ausdehnung der Gliedmaßenknospe und die damit korrelierende Zehenzahl wirkungsvoll, d.h. auf ein zumindest annähernd normales Maß zu beschränken.

Dabei ist auffällig, dass die Zehenzahl in Vorder- und Hinterbeinen unterschiedlich stark auf eine Reduktion der GLI3-Menge reagiert, denn im Allgemeinen weisen die Vordergliedmaßen eine stärkere Polydaktylie als die Hintergliedmaßen auf (Tab.1). Es konnte hier nicht geklärt werden, worauf dieser Unterschied zurückzuführen war, da die beobachteten Änderungen des Expressionsmuster einzelner Gene in Vorder- und Hinterknospen identisch waren. In diesem Zusammenhang bleibt allerdings zu bemerken, dass bisher auch über die Hintergründe weit weniger subtiler Unterschiede zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen nur sehr wenig bekannt ist. So existieren z.B. lediglich rudimentäre Vorstellungen davon, wie die jeweils höchst charakteristischen Anatomien einer Vorderpfote/Hand bzw. einer Hinterpfote/Fuß durch ein (soweit bekannt) nahezu identisches Musterbildungsprogramm hervorgebracht werden (Logan, 2003).

#### 4.1.2 Die Ausbildung der A/P-Achse

Wie eingangs bereits erwähnt, ist GLI3 an der Regulation mehrerer Aspekte der Gliedmaßenentwicklung beteiligt. So führt der Verlust von GLI3 neben einer ausgeprägten Polydaktylie auch zur Bildung stark deformierter und nicht segmentierter proximaler Phalangen. Dabei ist die Segmentierung des Zehenstrahls in voneinander getrennte Phalangen ein entscheidender Schritt in der Umsetzung der frühen molekularen A/P-Musterbildung in die dementsprechende Anatomie der jeweiligen Zehenidentitäten. Da berichtet wurde, dass der distale Phalanx an der Zehenspitze unabhängig von den Prozessen entsteht, die die Gesamtzahl der Phalangen pro Zehe festlegen, kommt der Segmentierung der proximalen Phalangen eine besondere Bedeutung zu (Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003). Es ist nämlich

genau dieser Vorgang, der entscheidet, ob die für anteriore Zehen charakteristischen zwei oder die für posteriore Zehen typischen drei Phalangen ausbildet werden.

Anders als bei der Regulation der Zehenzahl war zwischen dem Anstieg der GLI3-Menge und der damit einhergehenden Wiederherstellung der anteroposterioren Charakteristika allerdings ein direkterer, gradueller Zusammenhang festzustellen. Während die Formierung der proximalen Phalangen in *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen sehr stark beeinträchtigt ist, genügt bereits die in dieser Studie geringste GLI3-Menge in Gli3<sup>Pdn/-</sup>-Embryonen, um den normalen Segmentierungsprozess zu etablieren. Obwohl damit zwar die grundsätzliche Voraussetzung zur Ausbildung der verschiedenen Zehenidentitäten vorhanden wäre, reicht dieser niedrige GLI3-Gehalt offenbar dennoch nicht aus, um die normale A/P-Asymmetrie hervorzubringen. Gli3<sup>Pdn/-</sup>-Embryonen bilden symmetrische Pfoten aus, deren Zehen ausschließlich mit posterioren Merkmalen ausgestattet sind. Allerdings bewirkt bereits die nächsthöhere Stufe der GLI3-Menge, dass Gli3<sup>Pdn/Pdn</sup>-Embryonen auf der anterioren Seite meist biphalangeale Zehen entwickeln. Die über das normale Maß weit hinausgehende Länge dieser Zehen offenbart jedoch deutlich, dass in *Gli3<sup>Pdn/Pdn</sup>*-Embryonen noch keine vollständige Normalität der Achsenausbildung vorliegt. Gemessen an dem Bewertungsmaßstab, dass in allen untersuchten Embryonen eindeutig zu identifizierende posteriore und anteriore Zehenidentitäten vorkommen, ist eine stabile Etablierung der normalen A/P-Asymmetrie erst auf der Stufe der  $Gli3^{+/-}$ -Embryonen erreicht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeichnen also ein Bild, in dem sich quasi im Gleichschritt mit jeder Erhöhung der GLI3-Menge auch die A/P-Achsenausbildung weiter normalisiert. Dabei sind offenbar bereits geringe Mengen für die Ausbildung normaler posteriorer Identitäten ausreichend. Mit weiteren Erhöhungen der GLI3-Menge stellen sich schließlich fortlaufend auch die verschiedenen Charakteristika anteriorer Identität wieder ein, für die offenbar deutlich höhere GLI3-Mengen erforderlich sind. Es ist hierbei allerdings bemerkenswert, dass die Anzahl anteriorer Zehenidentitäten in  $Gli3^{#/+}$ -Embryonen nicht höher ist als in  $Gli3^{#/-}$ Embryonen. Schließlich besitzen  $Gli3^{#/+}$ -Embryonen, vor allem gemessen an den in diesem Versuchsansatz ansonsten genutzten Mengenabstufungen, deutlich mehr GLI3-Protein als die heterozygoten  $Gli3^{#/-}$ -Embryonen. Es entsteht also der Eindruck, dass ein Mindestmaß an GLI3 zwar unabdinglich ist, um die normale A/P-Asymmetrie zu etablieren, dass eine darüber hinaus gehende Erhöhung der GLI3-Menge jedoch wirkungslos bleibt. Die alleinige Betrachtung der quantitativ-defizitären Gli3-Mausmutanten ( $Gli3^{-}$ ,  $Gli3^{Pdn}$ ) könnte also durchaus zu der Annahme verleiten, dass die posterioren Zehen möglicherweise

unempfänglich für anteriorisierende Signale wären und deshalb von einer zusätzlichen Steigerung der GLI3-Menge unbeeinflusst blieben.

Die im Folgenden diskutierte Analyse der  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante widerlegte diese These jedoch und machte deutlich, dass eine Unempfänglichkeit der posterioren Zehen und eine darauf möglicherweise beruhende, prinzipielle Begrenzung der maximal möglichen Anteriorisierung nicht existiert.

#### 4.1.3 Isoformspezifische Beiträge zur A/P-Musterbildung

In früheren Arbeiten wurde vorgeschlagen, dass die Bildung verschiedener Zehenidentitäten durch den A/P-Gradienten des GLI3-FL:GLI3R-Verhältnisses festgelegt würde (Litingtung et al., 2002). Anteriore Identität würde sich demnach im Bereich mit der höchsten Prozessierungsrate, also dem niedrigsten GLI3-FL:GLI3R-Wert, manifestieren (Litingtung et al., 2002). Diese Theorie besagte also zum einen, dass die Relation beider Isoformen zueinander und weniger die absolute Menge der GLI3-Proteine der entscheidende Faktor bei der Identitätsspezifizierung sei. Zum anderen implizierte diese ,relative' Sichtweise, dass beiden Isoformen eine aktive Beteiligung an der anteroposterioren Musterbildung zugesprochen werden muss. Diese Theorie wurde durch eine kürzlich erschienene Publikation unterstützt, die berichtete, dass für die korrekte Spezifizierung von Zehenidentitäten unbedingt beide GLI3-Isoformen erforderlich seien (Wang et al., 2007).

Unter Verwendung der  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante sollten im Rahmen dieser Arbeit die spezifischen Beiträge der beiden Isoformen zur Entwicklung der Gliedmaßen näher untersucht werden. Dabei zeichnet sich die  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante zum einen durch die völlige Abwesenheit von GLI3-FL aus (Hill et al., 2007). Zum anderen wurde durch die hier vorgestellten Expressionsanalysen an  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mausmutanten deutlich, dass GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup> im Rahmen der A/P-Musterbildung jene Aktivität ausfüllt, die sonst der wildtypischen GLI3-Repressorform zugesprochen wird (ausführlicherer Vergleich in 4.2.2.2ff). Somit bot sich mit Hilfe der  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante die Möglichkeit, den musterbildenden Einfluss der GLI3-Repressorform auf die Gliedmaßenentwicklung isoliert von GLI3-FL zu untersuchen.

Sowohl nach anatomischen als auch nach molekularen Kriterien entwickelten homozygote  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mausmutanten einen deutlich erhöhten Anteil an anterioren Zehenidentitäten. Gleichzeitig war die Bildung der posterioren Zehen stark eingeschränkt, was sich entweder in einer starken Deformation der Skelettelemente oder sogar in der kompletten Abwesenheit der posterioren Zehen äußerte. Zur Beurteilung dieser Auffälligkeiten müssen die eingangs

beschriebenen zwei Aspekte der  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mausmutanten beachtet werden. Einerseits ist dies der totale Verlust von GLI3-FL. Zum anderen ergab die Gegenüberstellung des GLI3-Proteingehalts von wildtypischen Embryonen und Gli3<sup>4699</sup>-Mausmutanten eine in der Summe gleich hohe Gesamt-GLI3-Menge (Hill et al., 2007). Es muss demnach berücksichtigt werden, dass in  $Gli3^{\Delta 699 \Delta 699}$ -Mausmutanten, die nur eine einzige GLI3-Form produzieren, von einer im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Menge an GLI3-Repressormolekülen auszugehen ist. Um zu unterscheiden, welche der symptomatischen Auffälligkeiten der  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mausmutanten auf den gesteigerten GLI3-Repressoreinfluss und welche möglicherweise auf den Verlust von GLI3-FL zurückzuführen wären, wurden Gli3<sup>4699/-</sup>-Mausmutanten analysiert. Durch die Kombination von Gli3-Null- und Gli3<sup>4699</sup>-Mutante war es möglich, die GLI3<sup>4699</sup>-Menge zu GLI3-FL reduzieren und gleichzeitig ein freies System aufrechtzuerhalten. Bemerkenswerterweise entwickeln  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Mausmutanten sowohl anteriore als auch völlig normal geformte posteriore Zehenidentitäten. Der Anteil der anterioren Zehenidentität an der Gesamtzehenzahl ist in  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Mausmutanten etwas geringer als in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Mausmutanten. Dem ist zu entnehmen, dass die Menge an GLI3-Repressormolekülen, in diesem Fall stellvertreten durch  $GLI3^{\Delta 699}$ , direkt den Anteil der Zehen anteriorer Identität bestimmt. Der Eindruck einer "Anteriorisierungsbegrenzung", der während der Analyse der anderen GLI3-defizitären Mutanten entstehen konnte (s. 4.1.2), kann eindeutig verworfen werden. Die Entwicklung der posterioren Zehen ist also in keinster Weise insensitiv gegenüber einer Erhöhung der GLI3-Repressormenge. Neben dem gestiegenen Anteil anteriorer Zehenidentitäten zeigt sich dies auch eindeutig in der Dysmorphologie der posterioren Zehen von homozygoten  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Mausmutanten. Durch die Verwendung der hemizygoten  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Mausmutanten konnte darüber hinaus belegt werden, dass nicht etwa der Verlust von GLI3-FL entscheidend für die Fehlbildungen der posterioren Zehen der *Gli3*<sup>Δ699/Δ699</sup>-Mausmutanten war, sondern einzig die gesteigerte Menge an GLI3-Repressor. Die Tatsache, dass  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Mausmutanten morphologisch unauffällige anteriore und posteriore Zehenidentitäten ausbilden, implizierte sogar, dass GLI3-FL für die Etablierung sowohl anteriorer als auch posteriorer Zehenidentitäten völlig entbehrlich sei.

Dieses Ergebnis steht allerdings in deutlichem Kontrast zu der eingangs dieses Kapitels geschilderten Hypothese, dass GLI3-FL eine wichtige Aktivatorfunktion in der Gliedmaßenentwicklung einnehmen würde, ohne die keine normalen Zehenidentitäten entstehen könnten (Wang et al., 2007). Diese Aussage gründete sich auf Analysen eines gentechnisch veränderten GLI3-Allels ( $Gli3^{P1-4}$ ), das aufgrund der Mutation der ersten vier

70

PKA-Phosphorylierungsstellen (S-zu-A-Austausche) ausschließlich eine nicht prozessierbare hervorbringt (Wang et al., 2007). Dieses, an insgesamt GLI3-Form sieben Aminosäurepositionen veränderte GLI3<sup>P1-4</sup>-Protein (4 PKA-Phosphorylierungsstellen plus 3 weitere Aminosäuren-austausche im Bereich der AS-Positionen 846-914) wurde von den Autoren als vollwertige Entsprechung des endogenen GLI3-FL-Proteins interpretiert. Homozygote *Gli3<sup>P1-4</sup>*-Mutanten sind hochgradig polydaktyl, ohne Zehenidentitäten erkennen zu lassen. Eine Kreuzung von  $Gli3^{P1-4}$ - mit  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutanten bereitete dann die Grundlage zu der Interpretation, dass sowohl die GLI3-Repressorform als auch GLI3-FL als Aktivatorisoform für die Gliedmaßenentwicklung benötigt würden, denn Gli3<sup>P1-4/\D699</sup>-Embryonen bildeten anteriore und posteriore Zehenidentitäten aus. Eine kritische Beurteilung dieser publizierten Daten lässt allerdings auch Raum für deutlich andere Schlussfolgerungen.

Ganz abgesehen davon, dass zu diskutieren wäre, ob die Veränderung von GLI3<sup>P1-4</sup> an sieben Aminosäurepositionen nicht auch andere Funktionen als nur die Prozessierbarkeit betreffen könnte, denn dies würde die Interpretierbarkeit von GLI3<sup>P1-4</sup> als einem absolut gleichwertigen Vertreter des wildtypischen GLI3-FL natürlich in Frage stellen. Doch selbst wenn man die von Wang und Kollegen präsentierten Ergebnisse unter der Vorraussetzung betrachtet, dass GLI3<sup>P1-4</sup> tatsächlich das funktionelle Äquivalent zu GLI3-FL wäre, ergeben sich interessante Aspekte. So ist im Vergleich der Gliedmaßen von *Gli3<sup>P1-4/A699</sup>*-Mausmutanten mit denen von *Gli3<sup>4699/-</sup>*-Mutanten weder in Bezug auf die Polydaktylie noch hinsichtlich der anteroposterioren Zehenidentitäten ein Unterschied auszumachen. Das zeigt, dass die Präsenz von GLI3<sup>P1-4</sup> zu für die Entstehung der anteroposterioren Zehenidentitäten offensichtlich völlig unerheblich ist. Außerdem entsprechen die Gliedmaßen homozygoter *Gli3<sup>P1-4/-</sup>*-Embryonen. Entgegen der Behauptung der Autoren kann man die Phänotypen der verschiedenen *Gli3<sup>P1-4/-</sup>*-Mutanten also auch so interpretieren, dass GLI3<sup>P1-4</sup>, und damit eben möglicherweise auch das wildtypische GLI3-FL, in vivo kaum aktiv sind.

Insofern unterstützen die Ergebnisse von Wang und Kollegen, entgegen ihrer eigenen Interpretation, eher die hier vertretene These, dass GLI3-FL keinen aktiven Beitrag zur Etablierung der Zehenidentitäten leistet. Die Gesamtheit der Ergebnisse spricht vielmehr dafür, dass, zumindest im Rahmen der anteroposterioren Musterbildung, GLI3-FL lediglich einen inaktiven GLI3-Vorrat darstellt. In Abhängigkeit der von außen an die Zelle herangetragenen Positionsinformationen wird daraus die eigentlich aktive Isoform, nämlich GLI3R, rekrutiert.

#### 4.1.4 Anteroposteriore Asymmetrie jenseits von SHH- und GLI3-Einflüssen

In wildtypischen Embryonen wird der anteroposteriore Gradient der GLI3-Prozessierung durch inhibierende SHH-Signale reguliert, die von der posterior gelegenen "Zone polarisierender Aktivität" (ZPA) ausgehen. Wie oben dargelegt, spricht nun einiges dafür, dass GLI3-FL dabei lediglich als eine Art schnell verfügbarer Vorrat dient, aus dem in Abhängigkeit von der Entfernung zur SHH-Quelle, die aktive Isoform, GLI3R, gebildet wird.

In den  $Gli3^{\Delta 699}$ -Embryonen ist SHH aufgrund der ohnehin bestehenden Verkürzung des GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup>-Proteins jedoch die Möglichkeit genommen, über die Regulation der Prozessierung einen anteroposterioren Gradienten der GLI3-Repressormenge ausbilden zu können.

Nun stellt sich aber die Frage, wie es in  $Gli3^{\Delta 699}$ -Embryonen offenbar dennoch gewährleistet wird, dass es zu keiner gleichweg hohen  $GLI3^{\Delta 699}$ -Konzentration entlang der anteroposterioren Gliedmaßenachse kommt. Würde nämlich eine solche homogene Verteilung von  $GLI3^{\Delta 699}$  in den Mutanten vorliegen, dann sollte sowohl in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ - als auch in  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Embryonen nur jeweils eine Zehenidentität zu finden sein. Im Falle einer ausreichend hohen  $GLI3^{\Delta 699}$ -Proteinmenge sollten dann nur anteriore, im Falle einer niedrigen gleichmäßigen  $GLI3^{\Delta 699}$ -Konzentration nur posteriore Zehenidentitäten entstehen. Tatsächlich trifft dies aber weder auf  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ - noch auf  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Embryonen zu. Nicht alle Zehen von  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen besitzen anteriore Zehenidentität und in  $Gli3^{\Delta 699/-}$ -Embryonen entstehen sogar sowohl anteriore als auch völlig normale posteriore Identitäten nebeneinander. Es ist also davon auszugehen, dass  $GLI3^{\Delta 699}$  nicht in der gesamten distalen Gliedmaße in einer einheitlichen Konzentration vorliegt.

Demzufolge müssen neben der Regulation der GLI3-Prozessierung weitere Mechanismen existieren, die für ein anteroposteriores Gefälle der GLI3-Menge sorgen. Am naheliegendsten ist die Vermutung, dass diese zusätzlichen Mechanismen in die Regulation der *Gli3*-Transkription eingreifen. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass das Expressionsmuster von *Gli3* im Vergleich zwischen wildtypischen,  $Gli3^{-/-}$  und  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen keine auffälligen Abweichungen aufweist. In allen drei Fällen ist die Expression von *Gli3* im anterioren Bereich besonders stark und verliert nach posterior schnell an Intensität. Es wäre zunächst denkbar, dass SHH neben der Inhibierung der Prozessierung auch einen reprimierenden Einfluss auf die *Gli3*-Expression ausüben könnte, und so auf einem zweiten Weg einen anteroposterioren Gradienten des GLI3-Repressoreinflusses aufbauen würde. Die Analysen der *Shh*<sup>-/-</sup>; *Gli3*<sup> $\Delta 699/-</sup>-Embryonen zeigen aber, dass auch ohne SHH sowohl</sup>$
anteriore als auch posteriore Zehenidentitäten entstehen. Dieser sehr eindeutige Phänotyp spricht deutlich dafür, dass es trotz des SHH-Verlustes nicht zu einer deregulierten  $Gli3^{\Delta 699}$ -Expression und einer sich daraus ergebenden homogenen Verteilung des GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup>-Proteins kommt. Offenbar begrenzen in diesem Fall andere Faktoren die posteriore Expression von  $Gli3^{\Delta 699}$ .

Auch die Veränderungen der Expressionsmuster von A/P-Markergenen in *Gli3<sup>-/-</sup>*-Embryonen sprechen für die Existenz von zusätzlichen A/P-Musterbildungsmechanismen. Der Verlust von GLI3 macht sich nämlich vorrangig auf der anterioren Seite bemerkbar, wo die anteriorspezifische Genexpression sehr stark eingeschränkt wird. Die Domänen posteriorer Gene hingegen dehnen sich zwar teilweise nach anterior aus, zeigen aber weiterhin ein deutliches posteriores Übergewicht in ihrem Expressionsmuster. Trotz des weitreichenden Verlustes der Charakteristika der normalen anteroposterioren Musterbildung existiert also auch in den GLI3-defizitären Embryonen noch immer ein gewisses Maß an A/P-Asymmetrie. Dies lässt sich auch zu späteren Entwicklungszeitpunkten noch verfolgen. Während die anteriore Identität in älteren Gli3<sup>-/-</sup>-Embryonen zwar weiterhin fehlt, zeigen sowohl das Expressionsmuster von Gdf5 als auch die Knochen-Knorpel-Färbungen an, dass zumindest ein Rest posteriorer Zehenidentität zu erkennen ist. Je posteriorer die Position eines Zehes ist, desto mehr normalisiert sich die Phalangenformation, bis im posteriorsten Zeh die seiner Position entsprechenden drei Phalangen gebildet werden. Wie andere Gruppen berichtet haben, ist auch hieran kein Einfluss von SHH beteiligt, da der Phänotyp der Gliedmaßen von  $Gli3^{-/-}$ -Embryonen mit dem von  $Gli3^{-/-}$ :  $Shh^{-/-}$ -Embryonen absolut identisch ist (Litingtung et al., 2002).

Nun ist zwar durchaus bekannt, dass es frühe Musterbildungsprozesse gibt, die bereits vor dem Einsetzen der *Shh*-Expression in der Gliedmaßenknospe (etwa an Tag 9.5 der Embryonalentwicklung) die Grundlagen der anteroposterioren Asymmetrie legen. Allerdings ist angenommen worden, dass dabei zum einen GLI3 (mit seinem Gegenspieler dHAND) entscheidend beteiligt sein würde, und zum anderen, dass dieses sog. ,prepatterning' vornehmlich dazu dienen würde, die lokale Begrenzung der *Shh*-Expression sicherzustellen (Zuniga und Zeller, 1999; Fernandez-Teran et al., 2000; Charite et al., 2000; te Welscher et al., 2002A; Zakany et al., 2004). Nach Etablierung der *Shh*-Expression sollte dann SHH die eigentliche Musterbildung der distalen Gliedmaßenknospe regulieren.

Die deckungsgleichen Reste von A/P-Asymmetrie in sowohl  $Gli3^{--}$  als auch  $Gli3^{--}$ ;  $Shh^{--}$ -Embryonen basieren jedoch offensichtlich auf Musterbildungsvorgängen ohne die Beteiligung von GLI3 oder SHH. Es ist also davon auszugehen, dass andere, noch näher zu identifizierende Mechanismen der frühen Musterbildung existieren, die sich langfristiger als bisher erwartet auf die Architektur der distalen Gliedmaßenknospe auswirken. Es ist demnach wohl auch dieser GLI3- und SHH-unabhängigen, grundlegenden A/P-Musterbildung zu verdanken, dass die quantitative Verteilung von GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup> so reguliert wird, dass in *Gli3<sup>\Delta 699/-</sup>*-Embryonen alle Zehenidentitäten gebildet werden, die auch in wildtypischen Embryonen zu finden sind.

## **4.2** Die *Gli3*<sup>\(\Delta 699\)</sup>-Mutante als Tiermodell des Pallister-Hall-Syndroms

Das Pallister-Hall-Syndrom (PHS) ist eine pleiotrope Störung der menschlichen Embryonalentwicklung. Es wird durch Mutationen im mittleren Drittel des GLI3-Gens hervorgerufen, die zu einer C-terminalen Verkürzung des GLI3-Proteins führen. Das PHS umfasst eine Vielzahl von Symptomen, die von Fehlbildungen des Skeletts bis zu lebensbedrohlichen Mißbildungen der inneren Organe reichen (Auflistung der PHS-Symptome http://www.nlm.nih.gov/archive/20061212/mesh/jablonski/cgi/jablonski/syndrome cgifa17.html). Diese Symptome werden in nahezu ihrer vollen Bandbreite auch von der  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mausmutante entwickelt (Böse et al., 2002). Dabei ist jedoch zu bemerken, dass PHS im Menschen dominant vererbt wird, während sich die entsprechenden Auffälligkeiten erst in homozygoten  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mausmutanten ausprägen. Eine naheliegende Erklärung für diesen Sachverhalt bietet eine unterschiedliche Sensitivität der beiden Spezies gegenüber Schwankungen der GLI3-Dosis. Ähnliches wurde auch schon für mehrere andere embryonale Entwicklungsdefekte berichtet. So zeigen Mutationen der Gene GATA3, LMX1b, MSX2 and TBX1 im Menschen bereits im heterozygoten Zustand eine hohe Penetranz, während sich in heterozygoten Mäusen keine Veränderungen erkennen lassen (Chen et al., 1998B; Lim et al., 2000; Satokata et al., 2000; Jerome et al. 2001). In all diesen Fällen entwickeln erst die homozygoten Mäuse die Symptome, die den menschlichen Störungen entsprechen. Nichtsdestotrotz stellen diese Mäuse wichtige Untersuchungsmodelle dar und erlauben auf andere Weise nicht zugängliche Einblicke in die Vorgänge der entsprechenden menschlichen Krankheiten.

Allerdings kann die speziesabhängige Dosissensitivität die eindeutige Interpretation der gewonnenen Daten in manchen Fällen durchaus erschweren. Hinsichtlich der Aufklärung der PHS-Pathogenese entpuppte es sich hingegen als echter Vorteil, dass nur homozygote  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mausmutanten PHS-ähnliche Symptome entwickeln. Bislang war stets unklar, ob durch GLI3-FL ein wie auch immer gearteter Beitrag zur PHS-Pathogenese geleistet würde.

Es wäre z.B. durchaus denkbar gewesen, dass die enorme Abweichung der Gliedmaßenveränderungen zwischen polydaktylen PHS-Patienten und beinahe zehenlosen *Shh*-Mausmutanten darauf zurückzuführen wäre, dass in den menschlichen Patienten neben der GLI3<sup>PHS</sup>-Repressorform auch GLI3-FL vorhanden wäre. Im Gegensatz dazu würde in den *Shh*-Mausmutanten durch die exzessive GLI3-Prozessierung eine weitgehend GLI3R-exklusive Situation nahezu ohne GLI3-FL erreicht. Die Tatsache aber, dass ausschließlich die homozygoten *Gli3<sup>Δ699</sup>*-Embryonen PHS-ähnliche Symptome entwickeln, zeigt überzeugend, dass für die PHS-Pathogenese keine aktive Beteiligung des GLI3-FL-Proteins nötig ist, sondern die Defekte offenbar allein der unkontrollierten Aktivität des aberranten GLI3-Repressorproteins zugeschrieben werden können.

#### 4.2.1 Der oligodaktyle Phänotyp

Zu den Kriterien, die für die klinische Diagnosestellung des Pallister-Hall-Syndroms (PHS) erfüllt sein müssen, gehören charakteristische Fehlbildungen der Extremitäten. Unter den bei PHS-Patienten zu beobachtenden pathologischen Veränderungen nehmen diese Störungen eine besondere Stellung ein. Da die Gliedmaßenentwicklung allgemein ein wichtiges Forschungsgebiet für entwicklungsbiologische Vorgänge darstellt, existieren bereits recht umfangreiche Vorstellungen über die Rolle, die GLI3 innerhalb der Extremitätenausbildung einnimmt. In diesem Sinne ist es umso überraschender, dass ausgerechnet die Gliedmaßenveränderungen von PHS-Patienten weiterhin größere Fragen aufwerfen, die sich bisher der Beantwortung entzogen haben. Deshalb versprach die Aufklärung der bisher unverstandenen, zugrundeliegenden Mechanismen einen deutlichen Erkenntniszuwachs hinsichtlich des Funktionsspektrums des aberranten GLI3<sup>PHS</sup>-Proteins und damit der PHS-Pathogenese insgesamt.

Das Spektrum der deckungsgleichen Symptome von  $Gli3^{\Delta 699}$ -Maus und PHS-Patienten umfasst Verkürzungen der Gliedmaßen, Polydaktylie, Oligodaktylie und dysplastische Zehen bzw. Finger. Wenn man einen Querschnitt der klinischen PHS-Fallstudien betrachtet, sind die Berichte von Polydaktylie wesentlich zahlreicher als die von Oligodaktylie. Auch in der Zusammensetzung dieses Verhältnisses stimmt die Mausmutante mit dem menschlichen Bild überein, da Polydaktylie hier der Regelfall ist und nur eine Minderheit der  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen oligodaktyle Gliedmaßen besitzt. Die Silhouette der oligodaktylen Gliedmaßen wiederum spricht dafür, dass die Ursache der zahlenmäßigen Reduktion im Fehlen der posteriorsten Zehen zu suchen ist. Demnach scheint sich die in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen generell zu beobachtende Beeinträchtigung der posterioren Zehenidentitäten, die sich in polydaktylen Embryonen lediglich in einer Dysmorphologie der posterioren Zehen äußert, in manchen Fällen so stark auszuwirken, dass die posterioren Zehen völlig fehlen und so eine verringerte Zehenzahl das Ergebnis ist.

Das Fehlen der posterioren Zehen von  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen erinnert an das Krankheitsbild des Ulna-Mamma-Syndroms (UMS; auch: Schinzel-Syndrom), das auf ein Mutation im TBX3-Gen zurückzuführen ist (Bamshad et al., 1997). Für dieses Syndrom sind einige Symptome beschrieben worden, die auffällige Parallelen zu einigen Organdefekten von Pallister-Hall-Patienten aufweisen. Dazu zählen etwa so bedrohliche Komplikationen wie Verengungen (Stenosen) des Anus und der Luftröhre (Kang et al., 1997; Verloes et al., 1995; Übersicht http://www.orpha.net/consor/cgides UM-Syndroms unter: bin/OC\_Exp.php?Lng=DE&Expert=3138). Kontext Die unserem allerdings in aufschlussreichesten Überschneidungen zwischen Gli3<sup>4699/4699</sup>-Embryonen und dem Ulna-Mamma-Syndrom betreffen die Entwicklung der posterioren Gliedmaße. Ähnlich wie bei den oligodaktylen Gli3<sup>4699/4699</sup>-Embryonen fehlen UMS-Patienten häufig die posterioren Finger und Zehen (Bamshad et al., 1996). Auch in Studien am Hühnerembryo konnte demonstriert werden, dass Tbx-Gene für die Entstehung der posterioren Zehen und die Spezifizierung ihrer posterioren Identität von großer Bedeutung sind (Suzuki et al., 2004). Im Rahmen dieses Experiments wurde die normale Funktion von TBX2 und TBX3 durch die Expression mutanter, dominant-negativer Proteinformen inhibiert. In den milder veränderten Fällen zeigten die posterioren Zehen eine Anteriorisierung ihrer Identität. In den stärker betroffenen Gliedmaßen war sogar ein völliger Verlust der beiden posteriorsten Zehen zu verzeichnen gewesen (Suzuki et al., 2004).

Angesichts dieser Berichte erscheint es plausibel anzunehmen, dass die posteriore Reduktion der *Tbx2*- und *Tbx3*-Expression in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen für die Dysplasie der posterioren Zehen mitverantwortlich ist. Wie bei jedem pathogenen Vorgang ist selbstverständlich auch bei den Reduktionen der *Tbx2*- bzw. *Tbx3*-Expression von individuellen Schwankungen zwischen einzelnen Embryonen auszugehen. Demzufolge wird die mitunter auftretende Oligodaktylie der  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen die Fälle der extremsten *Tbx*-Reduktion darstellen, in denen die Bildung der posterioren Zehenidentitäten durch GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup> nicht nur behindert, sondern sogar völlig unterbunden wurde. Außerdem lassen die oben erwähnten Überschneidungen weiterer Organdefekte von PHS und UMS vermuten, dass die hier in den Gliedmaßen entdeckte Beziehung zwischen *Gli3* und *Tbx2/3* auch für die Entwicklung anderer Organe eine Rolle spielt und dementsprechend über die Gliedmaßenentwicklung hinaus an der Ausbildung weiterer Symptome von PHS-Patienten beteiligt ist.

#### 4.2.2 Der polydaktyle Phänotyp

In ihrer Mehrheit spiegeln die  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen das polydaktyle Ende des menschlichen Krankheitsbildes wider. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt war die Entstehung dieser PHS-assoziierten Polydaktylie äußerst rätselhaft, da dieser Phänotyp nicht mit der genetischen Ursache von PHS in Einklang zu bringen war.

PHS entsteht aufgrund von Mutationen, die im mittleren Drittel des GLI3-Gens lokalisiert sind und die Produktion eines verkürzten GLI3-Proteins vorhersagen (Johnston et al., 2005). Man geht daher allgemein davon aus, das die Symptome von PHS auf ein GLI3-Protein zurückzuführen wären, das einem konstitutiv aktiven GLI3-Repressorprotein entspräche (Johnston et al. 2005; Wang et al., 2000; Sasaki et al., 1999; Biesecker, 1997). Demgegenüber stehen die Ergebnisse der vor allem an Shh<sup>-/-</sup>-Mutanten durchgeführten genetischen Mausanalysen. Sie haben überzeugende Hinweise erbracht, dass das wildtypische GLI3-Repressorprotein einen stark negativen Effekt auf die Zellproliferation innerhalb der Gliedmaßenknospe hat und dadurch die spätere Anzahl an Zehen reduziert (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002). Daraus ergibt sich, dass bislang zwischen den aus Mausstudien gewonnenen Daten und dem Erklärungsansatz zur PHS-Pathogenese ein großer Widerspruch bestand. Auf Grundlage der Mausanalysen wäre für PHS-auslösende Mutationen zu erwarten, dass sie einen substantiellen Verlust an Zehen nach sich ziehen würden. Die Realität widerspricht dieser These allerdings überzeugend, da in den meisten Fällen das Gegenteil eintritt und eine Polydaktylie der PHS-Patienten zu verzeichnen ist. Es existieren prinzipiell zwei, im Folgenden diskutierte Möglichkeiten, diese Diskrepanz von theoretischer Vorhersage und beobachteter Realität zu interpretieren.

#### 4.2.2.1 Evolutionäre Konservierung der GLI3-Funktion

Da sich die auf Mausanalysen basierende Sichtweise der Funktion des GLI3-Repressors also nicht ohne weiteres mit den menschlichen Daten vereinbaren lässt, führt das notwendigerweise zu der prinzipiellen Frage, inwieweit die Funktion von GLI3 während der embryonalen Entwicklung von Maus und Mensch tatsächlich deckungsgleich ist. Dazu ist zunächst einmal zu bemerken, dass die Maus gerade deshalb zu einem beliebten Untersuchungsobjekt für medizinisch relevante Grundlagenstudien geworden ist, weil sie einen hervorragenden Kompromiß aus experimenteller Praktikabilität und evolutionärer Nähe zum Menschen darstellt. Es überzeugende Hinweise darauf, dass diese enge Verwandtschaft auch auf der Ebene des GLI3-Proteins besteht. Es konnten bereits einige Studien darlegen, dass die Funktion des GLI3-Proteins einen sehr hohen Grad an evolutionärer Konservierung aufweist, der sich selbst zwischen Spezies nachweisen lässt, die evolutionär deutlich weiter entfernt sind als Mensch und Maus. So wird das cubitus interruptus-Protein, das Taufliegen-Homolog der GLI-Proteine, genau wie GLI3 in Abhängigkeit von hedgehog-Signalen zu einem transkriptionellen Repressor prozessiert (Aza-Blanc et al., 1997). Wenn humanes GLI3 in der Taufliege exprimiert wird, dann wird es wie cubitus interruptus prozessiert und kann sogar die reprimierende Funktion des ci-Repressors in der Fliege ersetzen, was die funktionelle Konservierung zwischen Mensch und Fliege überzeugend belegt (Aza-Blanc et al., 2000; von Mering und Basler, 1999).

Auch unsere Studien an der  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante sprechen sich deutlich gegen einen nennenswerten Funktionsunterschied zwischen menschlichen und murinen GLI3-Proteinen aus. Bereits die ersten allgemeinen Analysen der Gli3<sup>4699</sup>-Mutante konnten zeigen, dass diese Maus eine umfassende Phänokopie des menschlichen PHS hervorbringt, und zwar auf der Grundlage einer entsprechenden Mutation, wie sie auch bei PHS-Patienten gefunden wurde (Böse et al., 2002). In der hier vorliegenden Fortsetzung der Untersuchungen wurden bei der Fokussierung auf die Gliedmaßen weitere, bisher für die  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante noch nicht beschriebene Merkmale entdeckt, die ebenfalls auch von PHS-Patienten berichtet wurden. Dazu zählt vor allem die Anteriorisierung der Gliedmaßen von  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Mausmutanten. die zu in einem Phänotyp führt, der weitreichende Überschneidungen mit den Ergebnissen einer vor kurzem erschienenen Fallstudie schwer betroffener PHS-Patienten besitzt. In den dort vorgestellten radiologischen Untersuchungen bemerkte man das Fehlen von proximalen Phalangen, das von Verkürzungen der Mittelhandknochen und der Phalangen des zweiten bis fünften Fingers begleitet wurde (Ng et al., 2004). Diese Beschreibung offenbart starke Parallelen zum Phänotyp von  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Mutanten, die ebenfalls verkürzte posteriore Zehen und Mittelfußknochen und einen erhöhten Anteil biphalangealer Zehen entwickeln.

Die Tatsache also, dass  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Mausmutanten und PHS-Patienten übereinstimmende Gliedmaßendefekte zeigen, zieht unweigerlich die Schlussfolgerung nach sich, dass sie auch die gleichen Unstimmigkeiten mit dem bestehenden GLI3-Repressor-Konzept aufweisen. Damit ist also klar, dass die eingangs geschilderte, scheinbare Unvereinbarkeit der weitgehend zehenlosen *Shh<sup>-/-</sup>*-Mausembryonen mit der PHS-assoziierten Polydaktylie beim Menschen nicht mit einer unterschiedlichen Funktion von GLI3 in den beiden Spezies begründet werden kann.

#### 4.2.2.2 Stellt GLI3<sup>4699</sup> einen vollwertigen Vertreter des wildtypischen GLI3R dar?

Die Unwahrscheinlichkeit einer speziesabhängigen Funktion von GLI3 wirft die zweite Frage auf: Inwieweit sind die durch Mutation verkürzten GLI3-Formen, sei es GLI3<sup>Δ699</sup> oder GLI3<sup>PHS</sup>, funktionell tatsächlich identisch zu dem endogen produzierten GLI3R? Um den Grad der Übereinstimmung überhaupt beurteilen zu können, ist natürlich von entscheidender Bedeutung, wie exakt die bislang existierenden Modelle die Funktion des GLI3-Repressors beschreiben konnten. Ein mögliches Manko bisheriger Theorien liegt darin, dass sie zu einem großen Teil auf Analysen von Shh-Mausmutanten basieren. Die Vorstellung, dass gesteigerte Mengen von GLI3R die Zehenzahl drastisch reduzieren würden, gründet sich beispielsweise darauf, dass der Phänotyp der Shh-Mausmutanten ausschließlich als Ergebnis der gesteigerten GLI3-Prozessierung gesehen wird (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002). Diese Sichtweise ist allerdings nur dann zulässig, wenn der Verlust von SHH in der Gliedmaßenknospe keine andere Konsequenz hätte, als die Deregulation der GLI3-Prozessierung nach sich zu ziehen. Nimmt man aber an, dass SHH außerhalb der GLI3-Prozessierung zusätzliche fördernde Einflüsse auf die Proliferation habe, dann könnte sich die phänotypische Diskrepanz zwischen den polydaktylen  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ - und den nahezu zehenlosen Shh<sup>-/-</sup>-Mausmutanten dadurch erklären lassen, dass in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ - Mutanten neben einer erhöhten GLI3-Repressormenge weiterhin SHH-Signale vorhanden sind. Allerdings müsste im Rückschluss dann erwartet werden, dass GLI3<sup>Δ699</sup> in Kombination mit der SHH-Defizienz nun ebenfalls zehenlose Gliedmaßen hervorbrächte. Wie an Gli3<sup>Δ699/Δ699</sup>;  $Shh^{-/-}$  bzw.  $Gli3^{\Delta 699/-}$ ;  $Shh^{-/-}$ -Mausmutanten zu sehen war, ist dies jedoch nicht der Fall. Vielmehr bestätigte sich der Eindruck, den bereits die phänotypische Ununterscheidbarkeit von  $Gli3^{--}$  und  $Gli3^{--}$ ;  $Shh^{--}$ -Embryonen vermittelt hatte (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002). Offenbar bleibt der Verlust von SHH immer dann ohne Effekt, wenn die GLI3-Prozessierung ohnehin nicht zu beeinflussen ist. Die hier vorliegenden Ergebnisse unterstützen also die These der früheren Publikationen, nach denen die Regulation von GLI3 tatsächlich die bei weitem bedeutendste, wenn nicht sogar einzige Rolle von SHH in der Gliedmaßenentwicklung darstellte (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002). Folglich ergab sich im Laufe dieser Untersuchungen kein Grund, an der Gültigkeit der bestehenden Modelle zu zweifeln, die, basierend auf dem zehenlosen Shh<sup>--</sup>-Phänotyp, dem wildtypischen GLI3R-Protein einen reprimierenden Einfluss auf die Zehenzahl zugesprochen haben. Konsequenterweise muss man aus unseren, den gängigen Theorien zuwiderlaufenden Ergebnissen schließen, dass zwischen der Funktion von GLI3<sup>2699</sup> und dem wildtypischen GLI3R gewisse Unterschiede bestehen.

#### 4.2.2.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von GLI3<sup>△699</sup> und GLI3R

Es konnte hier gezeigt werden, dass  $\text{GLI3}^{\Delta 699}$  eine Reihe von Funktionen erfüllt, die man auch dem wildtypischen GLI3R zuschreibt. Wie für GLI3R angenommen, reprimiert auch GLI3 $^{\Delta 699}$ die Expression von SHH-Zielgenen, wie z.B. Ptc1. Auch die weiteren Konsequenzen der Expression von  $GL13^{\Delta 699}$  auf die Musterbildung der Gliedmaße befinden sich im Einklang mit den Vorstellungen zur GLI3R-Funktion. In Gli3<sup>-/-</sup>-Embryonen macht sich der Verlust von GLI3 in der deutlichen Reduktion der anterior-spezifischen Genexpression bemerkbar, der auf der anderen Seite eine starke, anterior-gerichtete Expansion der Domänen posteriorer Genexpression gegenübersteht. Im Gegensatz dazu kommt es in Gli3<sup>Δ699/Δ699</sup>-Embryonen zur Etablierung einer im Prinzip normalen Verteilung anteriorer und posteriorer Genexpression. Es gelingt GLI3<sup>Δ699</sup> offenbar, die Expansion der posterioren Expressionsdomänen von *dHand*, Tbx2/3 und Hoxd12 zu verhindern und so die Ausprägung des anterior-spezifischen Genexpressionsmusters von Pax9 und Alx4 zu gewährleisten. Da die Situation in  $Gli3^{\Delta 699/\Delta 699}$ -Embryonen gewissermaßen eine Überproduktion des GLI3-Repressormoleküls darstellt, dessen Menge in wildtypischen Embryonen besonders im posterioren Bereich einer strengen Kontrolle durch SHH-Signale unterliegt, geht die Reprimierung der posterioren Genexpression über das normale wildtypische Maß hinaus. Als Folge davon entwickeln Gli3<sup>2699/2699</sup>-Embryonen einen erhöhten Anteil an Zehen anteriorer Identität und weisen außerdem Dysmorphologien der posterioren Zehen auf. Diese Effekte entsprechen absolut dem, was man auch von einer Überexpression der wildtypischen GLI3R-Isoform erwarten würde. Denn GLI3R wird als entscheidender Faktor für die Festlegung anteriorer Zehenidentitäten betrachtet, der, wenn im Übermaß vorhanden, der Bildung posteriorer Zehen entgegenwirkt (Ahn und Joyner, 2004; Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002); Chiang et al., 2001). Dementsprechend bleibt festzuhalten, dass die GLI3R zugeschriebene Rolle im Rahmen der anteroposterioren Musterbildung der Gliedmaßenknospe von GLI3<sup>4699</sup> voll ausgefüllt wird.

Dennoch deckten die erhaltenen Ergebnisse eben auch eine vorher nicht erwartete Diskrepanz zwischen GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup> und der allgemeinen Erwartungshaltung an GLI3R auf. So geht man davon aus, dass GLI3R einen negativen regulatorischen Effekt auf die Aufrechterhaltung des SHH/FGF-Regelkreises hat (Khohka et al., 2003; Aoto et al., 2002; Sun et al., 2002; te Welscher et al., 2002). Eine über das normale Maß hinausgehende Menge des GLI3R-Proteins führt zu einer vorzeitigen Terminierung des Regelkreises, was in der dramatisch verkrüppelten, fast zehenlosen Gliedmaße der *Shh<sup>-/-</sup>*-Mausmutanten resultiert (Litingtung et al., 2002). Im Gegensatz zu diesen Erwartungen werden die am SHH/FGF-Regelkreis beteiligten Genaktivitäten in der  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante nicht über das normale Maß hinaus reprimiert, wie an der im Vergleich zum Wildtyp unveränderten Expression von *Shh*, *Fgf*8 und *Gremlin* ersichtlich wurde. Unter der Voraussetzung, dass die aktuell favorisierten Theorien bezüglich der GLI3-Repressorfunktion völlig zutreffend sein sollten, lassen die vorliegenden Ergebnisse nur den Schluss zu, dass die Funktion des GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup>-Proteins lediglich in den Prozessen der Musterbildung dem endogen produzierten GLI3R entspräche. Demzufolge würde das GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup>-Protein demnach lediglich ein GLI3R-ähnliches Protein, aber eben kein GLI3R-äquivalentes Protein darstellen.

Das ist eine durchaus überraschende Erkenntnis, da bisherige Untersuchungsansätze keinen funktionellen Unterschied zwischen künstlich verkürzten, aber unterschiedlich langen GLI3-Proteinen aufzeigen konnten (siehe auch 4.3).

#### 4.2.3 Neue Erkenntnisse zur molekularen Grundlage des Pallister-Hall-Syndroms

Die Gemeinsamkeiten der zugrundeliegenden Mutationen, besonders aber die umfassenden symptomatischen Übereinstimmungen, die zwischen PHS-Patienten und Gli3<sup>Δ699/Δ699</sup>-Embryonen bestehen, machen es mehr als wahrscheinlich, dass sich die Funktionsweise von GLI3<sup>Δ699</sup> auf GLI3<sup>PHS</sup> übertragen lässt. Entgegen der bisherigen Erklärungen der PHS-Pathogenese konnte hier also gezeigt werden, dass die Ursache für PHS nicht einfach in einem Übermaß der normalen GLI3-Repressorfunktion zu suchen ist. Stattdessen stellt, basierend auf den Untersuchungen an GLI3<sup>4699</sup>, GLI3<sup>PHS</sup> wohl ein pathogenes Protein dar, das nur teilweise durch die vorliegenden Erkenntnisse über GLI3R beschrieben werden kann. Innerhalb der Musterbildung der Gliedmaße führen GLI3<sup>\[Delta699]</sup>/GLI3<sup>\[PHS]</sup> zu einer Anteriorisierung, die mit der prognostizierten Wirkung von GLI3R bzw. einem Übermaß von GLI3R in völligem Einklang steht. Die Zellproliferation, als Grundlage der späteren Zehenzahl, wird durch  $GLI3^{\Delta 699}/GLI3^{PHS}$  allerdings deutlich weniger effektiv gehemmt, als man dies von GLI3R erwarten würde. Nichtsdestotrotz muss festgehalten werden, dass auch  $GLI3^{\Delta 699}$  die unkontrollierte Expression der Gene verhindert, die an der Regulation der Proliferation beteiligt sind. Dies wird im direkten Vergleich mit Gli3<sup>-/-</sup>-Mausmutanten offensichtlich. Im Gegensatz zu Gli3<sup>-/-</sup>-Embryonen ist in Gli3<sup>4699/4699</sup>-Mausmutanten eine augenscheinlich normale posteriore Restriktion von Gremlin zu verzeichnen gewesen, was sich im Ergebnis auch in der deutlich milder ausgeprägten Polydaktylie von  $Gli3^{\Delta 699 \Delta 699}$ -Embryonen bemerkbar machte. D.h., dass GLI3<sup>Δ699</sup>/GLI3<sup>PHS</sup> auch bezüglich der Zellproliferation eine GLI3-Repressor-Funktion ausüben, jedoch ist sie schwächer als man für

das endogen produzierte GLI3R-Protein prognostiziert hat. Dabei ist interessant, dass die Untersuchungen der quantitativen Aspekte der GLI3-Funktion auch für das wildtypische GLI3 gezeigt haben, dass eine relativ hohe Menge an GLI3 benötigt wird, um eine Verringerung der Zehenzahl zu bewirken, wohingegen die Normalisierung der A/P-Musterbildung bereits bei wesentlich geringeren Mengen einsetzte. Somit scheint also auch für das wildtypische GLI3 zu gelten, dass es merklich effektiver darin ist, die A/P-relevante Genexpression zu regulieren, als darin, die Proliferation innerhalb der Gliedmaßenknospe zu begrenzen. Es scheint demnach so zu sein, dass durch die *Gli3<sup>Δ699</sup>*- bzw. *Gli3<sup>PHS</sup>*-Mutationen solche ,GLI3-Repressormoleküle' entstehen, die sich im Vergleich zum wildtypischen GLI3R durch eine weitere Schwächung der ohnehin labilen Proliferationsregulierung auszeichnen.

Worauf diese Diskrepanz zwischen GLI3R und GLI3<sup>Δ699</sup>/GLI3<sup>PHS</sup> zurückzuführen sein könnte, müssen weiterführende Untersuchungen ergeben. Denkbar wäre beispielsweise, dass GLI3R im Verlauf der endogen stattfindenden Prozessierung zusätzliche Modifikation erfährt, die über die bloße C-terminale Verkürzung hinausgehen. Es ist z.B. bekannt, dass am GLI3-FL-Protein verschiedenste Modifikationen vorgenommen werden, die für die Prozessierung zu GLI3R entscheidend sind. GLI3-FL wird zunächst durch mehrere Kinasen phosphoryliert, bevor es anschließend zu einer Ubiquitinierung kommen kann, durch die GLI3-FL der Prozessierung durch das Proteasom zugeführt wird (Tempé et al., 2006). Die in diesem Zusammenhang bisher beschriebenen Phosphorylierungen betreffen allerdings lediglich das GLI3-FL-Protein und sind im prozessierten GLI3R-Protein nicht mehr zu finden.

Die Inäquivalenz von GLI3<sup>Δ699</sup>/GLI3<sup>PHS</sup> und GLI3R könnte aber darauf hindeuten, dass es entweder während der Prozessierung oder aber auch zu anderen Zeitpunkten des wildtypischen ,GLI3-Lebenszyklus' zu weiteren, bisher noch nicht identifizierten Modifikationen oder Interaktionen mit Co-Faktoren kommt, die sich auf die transregulatorische Funktion von GLI3R auswirken könnten. Ein von vorneherein verkürztes GLI3-Protein, wie GLI3<sup>Δ699</sup> oder GLI3<sup>PHS</sup>, könnte diesem Zyklusverlauf entzogen sein und deshalb einige, vom endogen produzierten GLI3R abweichende Aktivitäten zeigen.

Nicht auszuschließen ist außerdem, dass sich die zwischen  $GLI3^{\Delta 699}$  und GLI3R ohnehin bestehenden, molekularen Unterschiede, wie die im Western Blot erkennbare Größendifferenz, funktionell auswirken. Weiteren Aufschluss über die Natur der Unterschiede zwischen diesen beiden Proteinen versprechen die in unserem Labor vor kurzem hergestellten, zusätzlichen *Gli3*-Mausmutanten. Sie produzieren GLI3-Proteine, die in einer Mutante weniger und in einer anderen stärker C-terminal verkürzt sind als  $GLI3^{\Delta 699}$ . Durch die konzertierte Untersuchung all dieser Mutanten ist somit nun eine Basis geschaffen worden, unsere Vorstellung der Funktion von GLI3 mit besonderem Fokus auf den C-Terminus weiter zu vertiefen.

# 4.3 Die *Gli3<sup>4699</sup>*-Mutante als Modellsystem zur detaillierteren Analyse der GLI3R-Funktion

Wie bereits an anderer Stelle dargelegt (siehe 4.2.2.3), spricht einiges dafür, dass GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup> und GLI3R im Prinzip übereinstimmende Funktionen aufweisen, wobei einzig die Proliferationsbegrenzung von GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup> weniger stark ausgeübt wird als durch GLI3R. Trotz aller im Verlaufe der Untersuchungen aufgetretenen Zweifel an der übereinstimmenden Funktion von GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup> und wildtypischem GLI3R, ergibt sich somit letztendlich doch ein Bild, das sich in weiten Teilen im Einklang mit der Erwartungshaltung zu Beginn dieser Arbeit befindet.

Zu Beginn der hier präsentierten Untersuchungen lag bereits eine Vielzahl von Veröffentlichungen vor, in denen die Funktion von unterschiedlich stark verkürzten GLI3-Proteinen in verschiedenen Modellsystemen behandelt worden war (Ruiz I Altaba, 1999; Shin et al., 1999; Wang et al., 2000; Persson et al., 2002; Meyer und Roelink, 2003). Dabei kam der jeweils genutzten Größe der verkürzten GLI3-Proteine keine größere Bedeutung bei der Interpretation der jeweiligen Ergebnisse zu. Zwar wurde in einem Fall davon berichtet, dass eine weniger stark verkürzte GLI3-Version (764 AS-Reste) zu einem gewissen Prozentsatz auch im Cytoplasma zu finden war und sich somit nur zu einem leicht verringerten Anteil an der eigentlichen Wirkungsstätte eines Transkriptionsfaktors, dem Zellkern, befand (Shin et al., 1999). Es wurde jedoch in keinem dieser Untersuchungsansätze jemals ein funktioneller Unterschied zwischen verschieden langen, C-terminal verkürzten GLI3-Proteinen festgestellt, so lange sie alle die unversehrte DNA-Bindedomäne besaßen. Dementsprechend war die Ausgangshypothese zu Beginn meiner Arbeit, dass es sich bei  $GLI3^{\Delta 699}$  um einen funktionell identischen Stellvertreter von GLI3R handeln würde. Mit der Gli3<sup>4699</sup>-Mutante sollte damit endlich ein Modellsystem zur Verfügung stehen, das die volle Bandbreite der von GLI3R ausgeübten Funktionen widerspiegeln und so eine erschöpfende Bestandsaufnahme eben dieser Aktivitäten ermöglichen würde. Im Verlaufe meiner Arbeit kristallisierte sich allerdings immer mehr heraus, dass zumindest in einigen Aspekten von einer Inäquivalenz von GLI3<sup>2699</sup> und GLI3R auszugehen war. Dies war insofern enttäuschend, als dass es hätte bedeuten können, dass zwar ein Großteil, aber eben nicht das gesamte GLI3R-Funktionsspektrum an der GLI3<sup> $\Delta 699$ </sup>-Mutante hätte untersucht werden können.

Es darf hier jedoch nicht unterschlagen werden, dass dieser Eindruck auch täuschen könnte. Was auf den ersten Blick wie eine Unzulänglichkeit von  $GLI3^{\Delta 699}$  erscheint, könnte sich letztendlich auch als Schwäche der bislang zur Verfügung stehenden Untersuchungsansätze und der daraus abgeleiteten Modelle zur GLI3R-Funktion herausstellen.

Es existieren nämlich durchaus einige experimentelle Daten, die in starkem Widerspruch zu den bisherigen Theorien stehen, da sie mit einem grundsätzlich negativen Effekt von GLI3R auf die Zahl der Zehen nicht in Einklang gebracht werden können. Ein Beispiel für einen solchen Fall bietet die Beobachtung, dass Mausembryonen, denen sowohl HOXD12 als auch HOXD13 fehlen, polydaktyle Gliedmaßen entwickeln (Kmita et al., 2002). Dies ist überraschend, da den HOXD-Proteinen bisher stets ein fördernder Effekt auf die Zehenbildung zugesprochen wurde (Knezevic et al., 1997; Zakany und Duboule, 1999). Da die Analyse unterschiedlicher Hoxd-Mausmutanten gezeigt hat, dass die Funktionen der verschiedenen HOXD-Proteine stark überlappen und dass sie gemeinsam in einer additiven, Dosis-abhängigen Weise wirken (Zakany et al., 1997; Fromental-Ramain et al., 1996; Wellik und Capecchi, 2003), wäre bei Verlust zweier HOXD-Proteine also mit einer Reduktion der Zehenzahl zu rechnen gewesen. Diese an sich schon bemerkenswerte Beobachtung, dass eine verminderte HOXD-Menge in den Gliedmaßenknospen der Hoxd12<sup>-/-</sup>; Hoxd13<sup>-/-</sup>-Mausmutanten eine Polydaktylie hervorbringt, enthält in dem Kontext dieser Arbeit allerdings noch weitere Brisanz. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass HOXD-Proteine direkt an GLI3R binden können und so, in direkter Abhängigkeit von der HOXD-Menge, den reprimierenden Eigenschaften von GLI3R entgegenwirken (Chen et al., 2004). Somit wird die normale Anzahl von fünf Zehen als das Ergebnis eines genau austarierten quantitativen Gleichgewichts zwischen dem negativen Effekt von GLI3R einerseits und dem entgegengesetzt wirkenden positiven Effekt der HOXD-Proteine andererseits interpretiert (Chen et al., 2004). Im Rückschluss bedeutete dies aber für die Hoxd12<sup>-/-</sup>; Hoxd13<sup>-/-</sup>-Mausmutanten, dass sich die erhebliche Mengenreduktion an HOXD-Proteinen in einer Steigerung der GLI3R-Wirkung und somit in einer Verminderung der Zehenzahl niederschlagen sollte. Immer vorausgesetzt natürlich, dass das nun ohne ein entsprechendes Gegengewicht agierende GLI3R tatsächlich einen so potenten negativen Faktor für die Proliferation und damit die spätere Zehenzahl darstellen sollte, wie die gängigen Modelle postulieren. Stattdessen entwickeln die Hoxd12<sup>-/-</sup>; Hoxd13<sup>-/-</sup>-Embryonen, in ähnlich überraschender Weise wie auch die  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mausmutanten, polydaktyle Gliedmaßen. Auch dieses Beispiel kollidiert also mit den gängigen Vorstellungen zur GLI3R-Funktion. Daraus ergibt sich, dass sich mit dem derzeitig vorliegenden Kenntnisstand nicht völlig ausschließen

lässt, dass GLI3<sup>Δ699</sup>, trotz aller gegenwärtigen Vorbehalte, ein noch präziseres Bild des tatsächlichen GLI3R-Funktionalitätsspektrums zeichnet, als momentan ohnehin schon zu erkennen ist.

Definitiv lässt sich bereits jetzt festhalten, dass durch die Verwendung der  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mausmutanten neue Erkenntnisse über die Funktion von GLI3 gewonnen werden können. So wurde im Laufe dieser Arbeit zum Beispiel deutlich, dass GLI3-FL weder für die Ausbildung der verschiedenen Zehenidentitäten benötigt wird, noch einen erkennbaren Beitrag zur PHS-Pathogenese leistet. Als bisher sicher informativste, aber keineswegs ideale Quelle der GLI3R-Funktionsaufklärung diente die *Shh*-Mutante. Zwar haben sich durch die Kreuzungen von *Gli3<sup>\Delta 699</sup>*- und *Shh*-Mausmutanten keine Hinweise ergeben, dass die Nutzung der *Shh*-Mausmutanten die bisherige Vorstellung zur GLI3R-Funktion in der Gliedmaße grob verfälscht hätte (siehe 4.2.2.2). Dennoch bringt die Verwendung dieser Mutanten nicht zu verleugnende experimentelle Limitierungen mit sich.

Zum einen beginnt die Degeneration der vom SHH-Verlust betroffenen Organe bereits kurz nach Ausbleiben der normalerweise einsetzenden Shh-Expression. Dies zieht weitreichende morphogenetische Fehlbildungen nach sich, die die Anatomie der Organe fast bis zur Unkenntlichkeit verändern. Dadurch ändert sich zwangsläufig auch der räumliche Bezug zwischen verschiedenen Gewebebereichen derart, dass unter den mutanten Bedingungen eine im Vergleich zum Wildtyp möglicherweise stark veränderte Nachbarschaft zwischen unterschiedlichen Gewebebereichen besteht. Da die Interaktion benachbarter Zellgruppen in vielen Entwicklungsvorgängen von entscheidender Bedeutung ist, ist leicht zu erfassen, dass die grundlegende Umstrukturierung der SHH-defizitären Organe einen nennenswerten Beitrag zum phänotypischen Gesamtbild leistet, der über den reinen Funktionsverlust von SHH hinausgeht. Deshalb ist die Aussagekraft dieser Mutanten hinsichtlich der GLI3R-Effekte nur auf ein relativ kleines Zeitfensters kurz nach der normalerweise einsetztenden Shh-Expression beschränkt. Die späteren Zeitpunkte der Organentwicklungen entziehen sich aus oben dargelegten Gründen einer eindeutigen Interpretierbarkeit hinsichtlich der Funktion von GLI3R. Hinzu kommt außerdem, dass, anders als im Falle der Gliedmaße, für die Entwicklung der meisten Organe gezeigt werden konnte, dass SHH nicht nur die GLI3-Prozessierung reguliert, sondern das auch die positive Vermittlung von SHH-Signalen durch GLI1 oder GLI2 entscheidend an der jeweiligen Organogenese beteiligt ist (Jacob und Briscoe, 2003; Lebel et al., 2007). Somit zieht der SHH-Verlust neben der Deregulation der GLI3-Prozessierung in den meisten Fällen zusätzlich auch einen generellen Verlust der Expression von SHH-Zielgenen nach sich. Dies schränkt die Interpretierbar- und damit Nutzbarkeit der *Shh*-Mausmutanten hinsichtlich der GLI3R-Funktionsaufklärung noch weiter ein.

Aus diesen Gründen ist es ohne Zweifel vorzuziehen, die Funktion von GLI3 in einem weitgehend normalen Organumfeld zu untersuchen, dessen Veränderungen eindeutig dem GLI3-Protein bzw. einer der beiden Isoformen zugeschrieben werden können. Wir glauben deshalb, dass die  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht nur den besten Zugang darstellt, die Pathogenese des Pallister-Hall-Syndroms genauer zu entschlüsseln. Mit ihrer Hilfe kann darüber hinaus auch ein wichtiger Beitrag dazu geleistet werden, die musterbildenden Eigenschaften von GLI3R zu analysieren, ohne sich den verfälschenden Bedingungen von  $Shh^{-/-}$ -Mausmutanten aussetzen zu müssen. Dadurch birgt die  $Gli3^{\Delta 699}$ -Mutante enormes Potential, die weitere Aufklärung des SHH-Signalweges voranzutreiben, der nicht nur für die embryonale Entwicklung, sondern aufgrund der Beteiligung an mehreren häufigen Krebserkrankungen auch für die Gesundheit des erwachsenen Menschen enorme Bedeutung besitzt.

## 5. Zusammenfassung

Das Pallister-Hall-Syndrom (PHS) ist eine autosomal-dominant vererbte, pleiotrope Entwicklungsstörung. Sie wird durch Mutationen im mittleren Drittel des GLI3-Gens ausgelöst, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen und so das GLI3-Protein C-terminal verkürzen. Damit ähnelt das aberrante GLI3<sup>PHS</sup>-Protein interessanterweise einer auch im gesunden Organismus vorkommenden, verkürzten GLI3-Isoform: In Abwesenheit von extrazellulären Hedgehog-Signalen wird das ,Voll-Längen-GLI3-Protein' durch posttranslationale Prozessierung zu einer kurzen Isoform (GLI3R) umgesetzt, die in den Zellkern eindringt und als Repressor von Zielgenen des Hedgehog-Signalwegs fungiert. Auf dieser Ähnlichkeit von GLI3R und GLI3<sup>PHS</sup> gründet sich die mittlerweile 10 Jahre alte These, dass die Ursache von PHS in einer konstitutiv aktiven GLI3-Repressorform zu suchen wäre. Diese Erklärung ist aber offenbar unzureichend, da neu publizierte Erkenntnisse zur Funktion der wildtypischen GLI3-Repressorisoform nicht mit der Symptomatik von PHS-Patienten in Einklang zu bringen sind. So wird ein Überschuss an GLI3R heute einerseits als Ursache des Verlustes nahezu aller Zehen in Shh<sup>-/-</sup>-Mausmutanten angesehen. Gleichzeitig soll auch die Entstehung von PHS auf ein Übermaß an GLI3-Repressoraktivität zurückzuführen sein, obwohl in PHS-Patienten häufig das Gegenteil, nämlich eine Vielfingrigkeit (Polydaktylie), zu beobachten ist. Anhand der Gli3<sup>2699</sup>-Mausmutante, die ein PHS-Tiermodell darstellt, wurden im Rahmen dieser Arbeit die phänotypischen und molekularen Konsequenzen analysiert, die sich aus einer pathogenen, PHS-verursachenden Verkürzung des GLI3-Proteins ergeben. Als Untersuchungsmodell wurde die anteroposteriore Musterbildung der Gliedmaße gewählt, da dieses System besonders sensitiv auf GLI3-betreffende Veränderungen reagiert. Durch Kreuzungen verschiedener Gli3-Mutanten untereinander und zum Teil auch mit Shh-Mutanten, sowie Analysen zur transkriptionellen Aktivität von GLI3<sup>Δ699</sup> konnten genauere Einblicke in die Funktion von GLI3 bzw. seiner Isoformen gewonnen werden. Außerdem wurde deutlich, dass sich die Funktion von GLI3<sup>2699</sup> nur in Teilen mit der deckte, die dem endogenen GLI3R zugesprochen wird:  $GLI3^{\Delta 699}$  hat auf die Zellproliferation einen weniger stark hemmenden Einfluss als das wildtypische GLI3R. Im Rahmen der embryonalen Musterbildung, d.h. in der Zuordnung von Positions- und damit Identitätsinformationen von Gewebebereichen während der Organogenese, entspricht die Funktion von  $GLI3^{\Delta 699}$  jedoch der GLI3R zugeschriebenen Wirkung. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse konnte die These zur molekularen Ursache von PHS so weit ergänzt werden, dass sie auch bisher unverstandene Aspekte der Symptomatik von PHS-Patienten erklären kann.

# 6. ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

#### <u>Abkürzungen</u>

Abb.	Abbildung	HSC	Hedgehog-Signalkomplex
AER	apikale Ektodermale Leiste	konz.	konzentriert
	(apical ectodermal ridge)	Kif	Kinesin family member
Alx4	Aristaless-like 4	Max.	Maximum
A/P	anteroposteriore Achse	Min.	Minimum
Bmp	Bone morphogenetic protein	PAP	Postaxiale Polydaktylie
Ci	cubitus interruptus	PPD	Präaxiale Polydaktylie
СК	Casein Kinase	Pax	Paired box gene
Cos2	Costal 2	PBS	Phosphate-buffered saline
CTD	C-terminale Domäne	PCR	Polymerase chain reaction
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PHS	Pallister-Hall-Syndrom
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser	Ptc	Patched
dHand	Heart- and neural crest	PKA	Proteinkinase A
	derivatives expressed 2, Hand2	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
dNTP	Desoxyribonukleotid-	s.	siehe
	triphosphat	SDS	Sodiumdodecylsulfate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Shh	Sonic Hedgehog
Fgf	Fibroblast growth factor	Smo	smoothened
Fu	Fused	SuFu	Suppressor of Fused
Gdf	Growth/Differentiation factor	Tbx	T-Box
Gli	Glioma-associated	Taq	Thermophilus aquatus
	oncogene homolog	Tab.	Tabelle
Gli2	Gli-Krüppel Family member 2	TE	Tris-EDTA-Puffer
Gli3	Gli-Krüppel Family member 3	Tris	Tris(hydroxymethyl)-
Gli3R	Gli3-Repressorisoform		amonimethan
Gli3-FL	Gli3-Voll-Längen-Isoform	TWEEN 20	Polyoxyethylen(20)-
GCPS	Greig Zephalopolysyndaktylie-		sorbitan-monolaurat
	Syndrom, Greig-Syndrom	UMS	Ulna-Mamma-Syndrom
GSK	Glycogen Synthase Kinase	vgl.	vergleiche
HC1	Salzsäure	z.B.	zum Beispiel
Hh	Hedgehog	ZPA	Zone polarisierender Aktivität
Hoxd	Homeobox D		

bp	Basenpaar(e)	mM	Millimolar
°C	Grad Celsius	μΜ	Mikromolar
kD	Kilo-Dalton	nm	Nanometer
g	Gramm	ng	Nanogramm
g	Erdbeschleunigung	pН	H+-Ionenkonzentration
h	Stunde(n)	pmol	pikomol
kD	Kilodalton	sec	Sekunde
1	Liter	t	Zeit
mg	Milligramm	Tm	temperature melting point
mM	Millimolar	tRNA	Transfer-RNA
μg	Mikrogramm	U	Enzymeinheit (unit)
μl	Mikroliter	Upm	Umdrehungen pro Minute
min	Minute	V	Volt
ml	Milliliter	(v/v)	Volumen auf Volumen
μl	Mikroliter	W	Watt
mmol	Millimol	(w/v)	Gewicht auf Volumen

# Einheiten:

# 7. Literatur

- Ahn, S. and Joyner, A.L. (2004) Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell*, 118, 505-16.
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M. and Hooper, J.E. (1996) The Drosophila smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell*, 86, 221-32.
- Aoto, K., Nishimura, T., Eto, K. and Motoyama, J. (2002) Mouse GLI3 regulates Fgf8 expression and apoptosis in the developing neural tube, face, and limb bud. *Developmental biology*, 251, 320-32.
- Athar, M., Li, C., Tang, X., Chi, S., Zhang, X., Kim, A.L., Tyring, S.K., Kopelovich, L., Hebert, J., Epstein, E.H., Jr. *et al.* (2004) Inhibition of smoothened signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of Fas expression and apoptosis. *Cancer Res*, 64, 7545-52.
- Aza-Blanc, P., Lin, H.Y., Ruiz i Altaba, A. and Kornberg, T.B. (2000) Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development (Cambridge, England)*, 127, 4293-301.
- Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F.A., Laget, M.P., Schwartz, C. and 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, 1043-53.
- Bai, C.B., Auerbach, W., Lee, J.S., Stephen, D. and Joyner, A.L. (2002) Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development (Cambridge, England)*, 129, 4753-61.
- **B**ai, C.B. and Joyner, A.L. (2001) Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development* (*Cambridge, England*), 128, 5161-72.
- Bai, C.B., Stephen, D. and Joyner, A.L. (2004) All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Developmental cell*, 6, 103-15.
- **B**ale, A.E. and Yu, K.P. (2001) The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Human molecular genetics,* 10, 757-62.
- Bamshad, M., Lin, R.C., Law, D.J., Watkins, W.C., Krakowiak, P.A., Moore, M.E., Franceschini, P., Lala, R., Holmes, L.B., Gebuhr, T.C. *et al.* (1997) Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nature genetics*, 16, 311-5.
- **B**amshad, M., Root, S. and Carey, J.C. (1996) Clinical analysis of a large kindred with the Pallister ulnar-mammary syndrome. *Am J Med Genet,* 65, 325-31.
- Benson, R.A., Lowrey, J.A., Lamb, J.R. and Howie, S.E. (2004) The Notch and Sonic

hedgehog signalling pathways in immunity. Mol Immunol, 41, 715-25.

- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M.R., Briggs,
  K., Parker, A.R., Shimada, Y., Eshleman, J.R., Watkins, D.N. *et al.* (2003)
  Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, 425, 846-51.
- Biesecker, L.G. (1997) Strike three for GLI3. Nature genetics, 17, 259-60.
- Biesecker, L.G. (2006) What you can learn from one gene: GLI3. J Med Genet, 43, 465-9.
- Biesecker, L.G., Abbott, M., Allen, J., Clericuzio, C., Feuillan, P., Graham, J.M., Jr., Hall, J., Kang, S., Olney, A.H., Lefton, D. *et al.* (1996) Report from the workshop on Pallister-Hall syndrome and related phenotypes. *Am J Med Genet*, 65, 76-81.
- **B**itgood, M.J., Shen, L. and McMahon, A.P. (1996) Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*, 6, 298-304.
- **B**öse, J. (2001) Etablierung und Analyse menschlicher GLI3 Mutationen in embryonalen Stammzellen der Maus und in Ma usen. *Inaugural-Dissertation*.
- **B**öse, J., Grotewold, L. and Rüther, U. (2002) Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3. *Human molecular genetics*, 11, 1129-35.
- **B**oulet, A.M., Moon, A.M., Arenkiel, B.R. and Capecchi, M.R. (2004) The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Developmental biology*, 273, 361-72.
- Brueton, L.A., Chotai, K.A., van Herwerden, L., Schinzel, A. and Winter, R.M. (1992) The acrocallosal syndrome and Greig syndrome are not allelic disorders. *J Med Genet*, 29, 635-7.
- Büscher, D., Bosse, B., Heymer, J. and Rüther, U. (1997) Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development. *Mechanisms of development*, 62, 175-82.
- **B**üscher, D. and Rüther, U. (1998) Expression profile of Gli family members and Shh in normal and mutant mouse limb development. *Dev Dyn*, 211, 88-96.
- Buttitta, L., Mo, R., Hui, C.C. and Fan, C.M. (2003) Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development (Cambridge, England)*, 130, 6233-43.
- Capdevila, J. and Izpisua Belmonte, J.C. (2001) Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 87-132.
- Capdevila, J., Tsukui, T., Rodriquez Esteban, C., Zappavigna, V. and Izpisua Belmonte, J.C. (1999) Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol Cell*, 4, 839-49.
- Charite, J., McFadden, D.G. and 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 (Cambridge, England)*, 127, 2461-70.

- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K.C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B. and Johnson, R.L. (1998B) Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nature genetics*, 19, 51-5.
- Chen, M.H., Gao, N., Kawakami, T. and Chuang, P.T. (2005) Mice deficient in the fused homolog do not exhibit phenotypes indicative of perturbed hedgehog signaling during embryonic development. *Mol Cell Biol*, 25, 7042-53.
- Chen, W., Ren, X.R., Nelson, C.D., Barak, L.S., Chen, J.K., Beachy, P.A., de Sauvage, F. and Lefkowitz, R.J. (2004) Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science*, 306, 2257-60.
- Chen, Y., Gallaher, N., Goodman, R.H. and Smolik, S.M. (1998A) Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2349-54.
- Chen, Y., Knezevic, V., Ervin, V., Hutson, R., Ward, Y. and Mackem, S. (2004) Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressor function to promote digit formation downstream of Shh. *Development (Cambridge, England)*, 131, 2339-47.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M.P., Simandl, B.K., Li, Y., Beachy, P.A. and Fallon, J.F. (2001) Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Developmental biology*, 236, 421-35.
- Clark, R.M., Marker, P.C., Roessler, E., Dutra, A., Schimenti, J.C., Muenke, M. und Kingsley,
   D.M. (2001) Reciprocal Mouse and Human Limb Phenotypes Caused by Gain- and
   Loss-of-Function Mutations Affecting Lmbr1. *Genetics*, 159, 715–726.
- **C**ohen, M.M., Jr. (1989) Perspectives on holoprosencephaly: Part I. Epidemiology, genetics, and syndromology. *Teratology*, 40, 211-35.
- Cohen, M.M., Jr. and Shiota, K. (2002) Teratogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet*, 109, 1-15.
- **C**orbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y. and Reiter, J.F. (2005) Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature*, 437, 1018-21.
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M. and Ishii, S. (1999) Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *The Journal* of biological chemistry, 274, 8143-52.
- **D**ellovade, T., Romer, J.T., Curran, T. and Rubin, L.L. (2006) The hedgehog pathway and neurological disorders. *Annu Rev Neurosci*, 29, 539-63.
- Denef, N., Neubuser, D., Perez, L. and Cohen, S.M. (2000) Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell*, 102, 521-31.
- Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J. and Hui, C.C. (1998) Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2

mutant mice. Development (Cambridge, England), 125, 2533-43.

- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A. and 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, 1417-30.
- Elson, E., Perveen, R., Donnai, D., Wall, S. and Black, G.C. (2002) De novo GLI3 mutation in acrocallosal syndrome: broadening the phenotypic spectrum of GLI3 defects and overlap with murine models. *J Med Genet*, 39, 804-6.
- Fan, L., Pepicelli, C.V., Dibble, C.C., Catbagan, W., Zarycki, J.L., Laciak, R., Gipp, J., Shaw,
  A., Lamm, M.L., Munoz, A. *et al.* (2004) Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology*, 145, 3961-70.
- Feldmann, G., Dhara, S., Fendrich, V., Bedja, D., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Alvarez, H., Iacobuzio-Donahue, C., Jimeno, A. *et al.* (2007) Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res*, 67, 2187-96.
- Fernandez-Teran, M., Piedra, M.E., Kathiriya, I.S., Srivastava, D., Rodriguez-Rey, J.C. and Ros, M.A. (2000) Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development (Cambridge, England)*, 127, 2133-42.
- Fromental-Ramain, C., Warot, X., Messadecq, N., LeMeur, M., Dolle, P. and Chambon, P. (1996) Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development (Cambridge, England)*, 2997-3011.
- **G**oodrich, L.V., Milenkovic, L., Higgins, K.M. and Scott, M.P. (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*, 277, 1109-13.
- **G**rau, Y. and Simpson, P. (1987) The segment polarity gene costal-2 in Drosophila. I. The organization of both primary and secondary embryonic fields may be affected. *Developmental biology*, 122, 186-200.
- Greig, D.M. (1926) Oxycephaly. Edinburgh Med. J., 189-218.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulous, P.G., Gailani, M.R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A.B., Gillies, S. *et al.* (1996) Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85, 841-51.
- Hall, J.G., Pallister, P.D., Clarren, S.K., Beckwith, J.B., Wiglesworth, F.W., Fraser, F.C., Cho, S., Benke, P.J. and Reed, S.D. (1980) Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus and postaxial polydactyly--a new syndrome? Part I: clinical, causal, and pathogenetic considerations. *Am J Med Genet*, 7, 47-74.
- Hayasaka, I., Nakatsuka, T., Fujii, T., Naruse, I. and Oda, S. (1980) Polydactyly Nagoya, Pdn: A new mutant gene in the mouse. *Jikken Dobutsu,* 29, 391-5.

- Haycraft, C.J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E.J. and Yoder, B.K. (2005) Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet*, 1, e53.
- High, A. and Zedan, W. (2005) Basal cell nevus syndrome. Curr Opin Oncol, 17, 160-6.
- Hill, P., Wang, B. und Rüther, U. (2007) The molecular basis of Pallister-Hall associated polydactyly. *Human molecular genetics*, 16, 2089-96.
- Holtke, H.J., Ankenbauer, W., Muhlegger, K., Rein, R., Sagner, G., Seibl, R. and Walter, T. (1995) The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids--an overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 41, 883-905.
- Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M. and Harland, R.M. (1998) The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell*, 1, 673-83.
- Huangfu, D. and Anderson, K.V. (2006) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* (*Cambridge, England*), 133, 3-14.
- Hughes, D.C., Allen, J., Morley, G., Sutherland, K., Ahmed, W., Prosser, J., Lettice, L., Allan,
  G., Mattei, M.G., Farrall, M. *et al.* (1997) Cloning and sequencing of the mouse Gli2 gene: localization to the Dominant hemimelia critical region. *Genomics*, 39, 205-15.
- Hui, C.C. and Joyner, A.L. (1993) A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nature genetics,* 3, 241-6.
- Hynes, M., Stone, D.M., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Goddard, A., Gurney, A. and 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.
- Incardona, J.P., Gruenberg, J. and Roelink, H. (2002) Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothened in endosomes. *Curr Biol*, 12, 983-95.
- Incardona, J.P. and Roelink, H. (2000) The role of cholesterol in Shh signaling and teratogen-induced holoprosencephaly. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1709-19.
- Ingham, P.W. (2001) Hedgehog signaling: a tale of two lipids. Science, 294, 1879-81.
- Ingham, P.W. and McMahon, A.P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development*, 15, 3059-87.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96, 23-8.
- Ito, H., Akiyama, H., Shigeno, C., Iyama, K., Matsuoka, H. and Nakamura, T. (1999) Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 443-51.
- Jacob, J., Briscoe, J. (2003) Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. EMBO

reports, 4, 761-765.

- Jerome, L.A. and Papaioannou, V.E. (2001) DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nature genetics,* 27, 286-91.
- Jia, J. and Jiang, J. (2006) Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell Mol Life Sci*, 63, 1249-65.
- Jia, J., Tong, C. and Jiang, J. (2003) Smoothened transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-terminal tail. *Genes & development*, 17, 2709-20.
- Jia, J., Tong, C., Wang, B., Luo, L. and Jiang, J. (2004) Hedgehog signalling activity of Smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature*, 432, 1045-50.
- Johnson, D.R. (1967) Extra-toes: anew mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse. *J Embryol Exp Morphol*, 17, 543-81.
- Johnston, J.J., Olivos-Glander, I., Killoran, C., Elson, E., Turner, J.T., Peters, K.F., Abbott, M.H., Aughton, D.J., Aylsworth, A.S., Bamshad, M.J. *et al.* (2005) Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. *American journal of human genetics,* 76, 609-22.
- Kalderon, D. (2004) Hedgehog signaling: Costal-2 bridges the transduction gap. *Curr Biol*, 14, R67-9.
- Kalff-Suske, M., Wild, A., Topp, J., Wessling, M., Jacobsen, E.M., Bornholdt, D., Engel, H., Heuer, H., Aalfs, C.M., Ausems, M.G. *et al.* (1999) Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Human molecular genetics*, 8, 1769-77.
- Kang, S., Graham, J.M., Jr., Olney, A.H. and Biesecker, L.G. (1997) GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nature genetics*, 15, 266-8.
- Karhadkar, S.S., Bova, G.S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J.T., Berman, D.M. and Beachy, P.A. (2004) Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*, 431, 707-12.
- **K**asper, M., Regl, G., Frischauf, A.M. and Aberger, F. (2006) GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer*, 42, 437-45.
- Keeler, R.F. (1978) Cyclopamine and related steroidal alkaloid teratogens: their occurrence, structural relationship, and biologic effects. *Lipids,* 13, 708-15.
- Khokha, M.K., Hsu, D., Brunet, L.J., Dionne, M.S. and Harland, R.M. (2003) Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nature genetics*, 34, 303-7.

- Kinzler, K.W., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Trent, J.M., Law, M.L., O'Brien, S.J., Wong, A.J. and Vogelstein, B. (1987) Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*, 236, 70-3.
- **K**inzler, K.W. and Vogelstein, B. (1990) The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol*, 10, 634-42.
- Kmita, M., Fraudeau, N., Herault, Y. and Duboule, D. (2002) Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of Hoxd genes in limbs. *Nature*, 420, 145-50.
- Knezevic, V., De Santo, R., Schughart, K., Huffstadt, U., Chiang, C., Mahon, K. A. and Mackem, S. (1997) Hoxd-12 differentially affects preaxial and postaxial chondrogenic branches in the limb and regulates Sonic hedgehog in a positive feedback loop. *Developmen*, 4523-4536.
- **K**raus, P., Fraidenraich, D. and Loomis, C.A. (2001) Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mechanisms of development,* 100, 45-58.
- Krauss, S., Concordet, J.P. and Ingham, P.W. (1993) A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*, 75, 1431-44.
- Kuijper, S., Feitsma, H., Sheth, R., Korving, J., Reijnen, M. and Meijlink, F. (2005) Function and regulation of Alx4 in limb development: complex genetic interactions with Gli3 and Shh. *Developmental biology*, 285, 533-44.
- Lanske, B., Karaplis, A.C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L.H., Ho, C., Mulligan, R.C. *et al.* (1996) PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science*, 273, 663-6.
- Laufer, E., Nelson, C.E., Johnson, R.L., Morgan, B.A. and Tabin, C. (1994) Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell*, 79, 993-1003.
- Lebel, M., Mo, R., Shimamura, K. und Chi-chung Hui, C.C. (2007) Gli2 and Gli3 play distinct roles in the dorsoventral patterning of the mouse hindbrain. *Developmental biology*, 302, 345-355.
- Lee, J., Platt, K.A., Censullo, P. and Ruiz i Altaba, A. (1997) Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development (Cambridge, England)*, 124, 2537-52.
- Lei, Q., Zelman, A.K., Kuang, E., Li, S. and Matise, M.P. (2004) Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development (Cambridge, England)*, 131, 3593-604.
- Lewandoski, M., Sun, X. and Martin, G.R. (2000) Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nature genetics*, 26, 460-3.

- Lim, K.C., Lakshmanan, G., Crawford, S.E., Gu, Y., Grosveld, F. and Engel, J.D. (2000) Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nature genetics*, 25, 209-12.
- Litingtung, Y. and Chiang, C. (2000) Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci*, 3, 979-85.
- Litingtung, Y., Dahn, R.D., Li, Y., Fallon, J.F. and Chiang, C. (2002) Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*, 418, 979-83.
- Logan, M. (2003) Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development* (*Cambridge, England*), 130, 6401-10.
- Lum, L. and Beachy, P.A. (2004) The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*, 304, 1755-9.
- Lum, L., Zhang, C., Oh, S., Mann, R.K., von Kessler, D.P., Taipale, J., Weis-Garcia, F., Gong, R., Wang, B. and Beachy, P.A. (2003) Hedgehog signal transduction via Smoothened association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Mol Cell*, 12, 1261-74.
- Mann, R.K. and Beachy, P.A. (2004) Novel lipid modifications of secreted protein signals. Annu Rev Biochem, 73, 891-923.
- Marigo, V., Johnson, R.L., Vortkamp, A. and Tabin, C.J. (1996) Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Developmental biology*, 180, 273-83.
- Masuya, H., Sagai, T., Wakana, S., Moriwaki, K. and Shiroishi, T. (1995) A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes & development,* 9, 1645-53.
- Matise, M.P., Epstein, D.J., Park, H.L., Platt, K.A. and 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 (Cambridge, England)*, 125, 2759-70.
- McDermott, A., Gustafsson, M., Elsam, T., Hui, C.C., Emerson, C.P., Jr. and Borycki, A.G. (2005) Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation. *Development (Cambridge, England)*, 132, 345-57.
- **M**cGlinn, E. and Tabin, C.J. (2006) Mechanistic insight into how Shh patterns the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 426-32.
- McGlinn, E., van Bueren, K.L., Fiorenza, S., Mo, R., Poh, A.M., Forrest, A., Soares, M.B., Bonaldo Mde, F., Grimmond, S., Hui, C.C. *et al.* (2005) Pax9 and Jagged1 act downstream of Gli3 in vertebrate limb development. *Mechanisms of development*, 122, 1218-33.
- McMahon, A.P., Ingham, P.W. and Tabin, C.J. (2003) Developmental roles and clinical

significance of hedgehog signaling. Curr Top Dev Biol, 53, 1-114.

- Meloni, A.R., Fralish, G.B., Kelly, P., Salahpour, A., Chen, J.K., Wechsler-Reya, R.J., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (2006) Smoothened signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol Cell Biol*, 26, 7550-60.
- Meyer, N.P. and Roelink, H. (2003) The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Developmental biology*, 257, 343-55.
- Michaud, E.J. and Yoder, B.K. (2006) The primary cilium in cell signaling and cancer. *Cancer Res,* 66, 6463-7.
- Milenkovic, L., Goodrich, L.V., Higgins, K.M. and Scott, M.P. (1999) Mouse patched1 controls body size determination and limb patterning. *Development (Cambridge, England)*, 126, 4431-40.
- Ming, J.E., Kaupas, M.E., Roessler, E., Brunner, H.G., Golabi, M., Tekin, M., Stratton, R.F., Sujansky, E., Bale, S.J. and Muenke, M. (2002) Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Hum Genet*, 110, 297-301.
- 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. *et al.* (1997) Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* (*Cambridge, England*), 124, 113-23.
- Motoyama, J. (2006) Essential roles of Gli3 and sonic hedgehog in pattern formation and developmental anomalies caused by their dysfunction. *Congenit Anom (Kyoto),* 46, 123-8.
- Motoyama, J., Milenkovic, L., Iwama, M., Shikata, Y., Scott, M.P. and Hui, C.C. (2003) Differential requirement for Gli2 and Gli3 in ventral neural cell fate specification. *Developmental biology*, 259, 150-61.
- **M**urone, M., Rosenthal, A. and de Sauvage, F.J. (1999) Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex. *Curr Biol*, 9, 76-84.
- Nakano, Y., Nystedt, S., Shivdasani, A.A., Strutt, H., Thomas, C. and Ingham, P.W. (2004) Functional domains and sub-cellular distribution of the Hedgehog transducing protein Smoothened in Drosophila. *Mechanisms of development*, 121, 507-18.
- **N**eubuser, A., Koseki, H. and Balling, R. (1995) Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Developmental biology*, 170, 701-16.
- Ng, D., Johnston, J.J., Turner, J.T., Boudreau, E.A., Wiggs, E.A., Theodore, W.H. and Biesecker, L.G. (2004) Gonadal mosaicism in severe Pallister-Hall syndrome. *American journal of medical genetics*, 124, 296-302.

- **N**ieuwenhuis, E. and Hui, C.C. (2005) Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clinical genetics*, 67, 193-208.
- **N**iswander, L., Jeffrey, S., Martin, G.R. and Tickle, C. (1994) A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature*, 371, 609-12.
- **N**usse, R. (2003) Whits and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development (Cambridge, England),* 130, 5297-305.
- **N**usslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature*, 287, 795-801.
- Ogden, S.K., Ascano, M., Jr., Stegman, M.A., Suber, L.M., Hooper, J.E. and Robbins, D.J. (2003) Identification of a functional interaction between the transmembrane protein Smoothened and the kinesin-related protein Costal2. *Curr Biol*, 13, 1998-2003.
- **O**hlmeyer, J.T. and Kalderon, D. (1998) Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. *Nature*, 396, 749-53.
- **O**ro, A.E. (2006) Mammalian variations on a theme: a Smo and Sufu surprise. *Developmental cell*, 10, 156-8.
- **O**sterlund, T. and Kogerman, P. (2006) Hedgehog signalling: how to get from Smo to Ci and Gli. *Trends Cell Biol*, 16, 176-80.
- Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L. and Wang, B. (2006) Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol*, 26, 3365-77.
- Park, H.L., Bai, C., Platt, K.A., Matise, M.P., Beeghly, A., Hui, C.C., Nakashima, M. and Joyner, A.L. (2000) Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development (Cambridge, England)*, 127, 1593-605.
- Pasca di Magliano, M. and Hebrok, M. (2003) Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*, 3, 903-11.
- **P**avletich, N.P. and Pabo, C.O. (1993) Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science*, 261, 1701-7.
- Persson, M., Stamataki, D., te Welscher, P., Andersson, E., Böse, J., Rüther, U., Ericson, J. and Briscoe, J. (2002) Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes & development*, 16, 2865-78.
- Peters, H., Neubuser, A., Kratochwil, K. and Balling, R. (1998) Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes & development,* 12, 2735-47.
- Philip, N., Apicella, N., Lassman, I., Ayme, S., Mattei, J.F. and Giraud, F. (1988) The acrocallosal syndrome. *Eur J Pediatr*, 147, 206-8.
- Pizette, S. and Niswander, L. (1999) BMPs negatively regulate structure and function of the

limb apical ectodermal ridge. Development (Cambridge, England), 126, 883-94.

- Platt, K.A., Michaud, J. and 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. *Mechanisms of development*, 62, 121-35.
- **P**reat, T. (1992) Characterization of Suppressor of fused, a complete suppressor of the fused segment polarity gene of Drosophila melanogaster. *Genetics*, 132, 725-36.
- Preat, T., Therond, P., Limbourg-Bouchon, B., Pham, A., Tricoire, H., Busson, D. and Lamour-Isnard, C. (1993) Segmental polarity in Drosophila melanogaster: genetic dissection of fused in a Suppressor of fused background reveals interaction with costal-2. *Genetics*, 135, 1047-62.
- Price, M.A. and Kalderon, D. (1999) Proteolysis of cubitus interruptus in Drosophila requires phosphorylation by protein kinase A. *Development (Cambridge, England)*, 126, 4331-9.
- Price, M.A. and Kalderon, D. (2002) Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell*, 108, 823-35.
- Qu, S., Niswender, K.D., Ji, Q., van der Meer, R., Keeney, D., Magnuson, M.A. and Wisdom,
   R. (1997) Polydactyly and ectopic ZPA formation in Alx-4 mutant mice. *Development* (*Cambridge, England*), 124, 3999-4008.
- Radhakrishna, U., Bornholdt, D., Scott, H.S., Patel, U.C., Rossier, C., Engel, H., Bottani, A., Chandal, D., Blouin, J.L., Solanki, J.V. *et al.* (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. *American journal of human genetics,* 65, 645-55.
- **R**adhakrishna, U., Wild, A., Grzeschik, K.H. and Antonarakis, S.E. (1997) Mutation in GLI3 in postaxial polydactyly type A. *Nature genetics,* 17, 269-71.
- **R**ahnama, F., Toftgard, R. and Zaphiropoulos, P.G. (2004) Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem J*, 378, 325-34.
- Rallu, M., Machold, R., Gaiano, N., Corbin, J.G., McMahon, A.P. and Fishell, G. (2002)
   Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both
   Gli3 and Hedgehog signaling. *Development (Cambridge, England)*, 129, 4963-74.
- **R**eifenberger, J. (2007) [Basal cell carcinoma. Molecular genetics and unusual clinical features]. *Hautarzt*, 58, 406-11.
- Reifenberger, J., Wolter, M., Knobbe, C.B., Kohler, B., Schonicke, A., Scharwachter, C., Kumar, K., Blaschke, B., Ruzicka, T. and Reifenberger, G. (2005) Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*, 152, 43-51.

- **R**iddle, R.D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T.M. and Tabin, C. (1995) Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*, 83, 631-40.
- **R**iddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E. and Tabin, C. (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75, 1401-16.
- **R**iobo, N.A. and Manning, D.R. (2007) Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem. J.*, 403, 369–379.
- **R**obert, B. and Lallemand, Y. (2006) Anteroposterior patterning in the limb and digit specification: contribution of mouse genetics. *Dev Dyn*, 235, 2337-52.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe,
   Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T.M. *et al.* (1994) Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell*, 76, 761-75.
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S.W., Tsui, L.C. and Muenke, M. (1996) Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nature genetics*, 14, 357-60.
- **R**ohatgi, R., Milenkovic, L. and Scott, M.P. (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*, 317, 372-6.
- **R**omer, J. and Curran, T. (2005) Targeting medulloblastoma: small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics. *Cancer Res,* 65, 4975-8.
- Ros, M.A., Dahn, R.D., Fernandez-Teran, M., Rashka, K., Caruccio, N.C., Hasso, S.M., Bitgood, J.J., Lancman, J.J. and Fallon, J.F. (2003) The chick oligozeugodactyly (ozd) mutant lacks sonic hedgehog function in the limb. *Development (Cambridge, England)*, 130, 527-37.
- **R**uel, L., Rodriguez, R., Gallet, A., Lavenant-Staccini, L. and Therond, P.P. (2003) Stability and association of Smoothened, Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog. *Nat Cell Biol*, 5, 907-13.
- Ruiz i Altaba, A. (1999) Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development (Cambridge, England)*, 126, 3205-16.
- Ruppert, J.M., Kinzler, K.W., Wong, A.J., Bigner, S.H., Kao, F.T., Law, M.L., Seuanez, H.N., O'Brien, S.J. and Vogelstein, B. (1988) The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol*, 8, 3104-13.
- **R**uppert, J.M., Vogelstein, B., Arheden, K. and Kinzler, K.W. (1990) GLI3 encodes a 190kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity. *Mol Cell Biol*, 10, 5408-15.
- Sagai, T., Hosoya, M., Mizushina, Y., Tamura, M. and Shiroishi, T. (2005) Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh

expression and truncation of the mouse limb. *Development (Cambridge, England)*, 132, 797-803.

- Sanchez, P., Clement, V. and Ruiz i Altaba, A. (2005) Therapeutic targeting of the Hedgehog-GLI pathway in prostate cancer. *Cancer Res*, 65, 2990-2.
- Sanchez, P., Hernandez, A.M., Stecca, B., Kahler, A.J., DeGueme, A.M., Barrett, A., Beyna, M., Datta, M.W., Datta, S. and Ruiz i Altaba, A. (2004) Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 12561-6.
- Sanchez-Herrero, E., Couso, J.P., Capdevila, J. and Guerrero, I. (1996) The fu gene discriminates between pathways to control dpp expression in Drosophila imaginal discs. *Mechanisms of development*, 55, 159-70.
- **S**anz-Ezquerro, J.J. and Tickle, C. (2003) Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol*, 13, 1830-6.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M. and 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 (Cambridge, England)*, 126, 3915-24.
- Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S. *et al.* (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nature genetics*, 24, 391-5.
- Saunders, J.W.Jr. and Gasseling, M.T. (1968) Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. *Epithelial-Mesenchymal Interactions (*eds Fleischmajer R, Billingham RE), 78–97.
- Schimmang, T., Lemaistre, M., Vortkamp, A. and Rüther, U. (1992) Expression of the zinc finger gene Gli3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt). *Development (Cambridge, England),* 116, 799-804.
- Schimmang, T., Oda, S.I. and Rüther, U. (1994) The mouse mutant Polydactyly Nagoya (Pdn) defines a novel allele of the zinc finger gene Gli3. *Mamm Genome*, 5, 384-6.
- Schinzel, A. (1979) Postaxial polydactyly, hallux duplication, absence of the corpus callosum, macrencephaly and severe mental retardation: a new syndrome? *Helv Paediatr Acta,* 34, 141-6.
- Schwabe, G.C. and Mundlos, S. (2004) Genetics of congenital hand anomalies. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 36, 85-97.
- Sheng, T., Li, C., Zhang, X., Chi, S., He, N., Chen, K., McCormick, F., Gatalica, Z. and Xie, J. (2004) Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer*, 3, 29.
- Shin, S.H., Kogerman, P., Lindstrom, E., Toftgard, R. and Biesecker, L.G. (1999) GLI3

mutations in human disorders mimic Drosophila cubitus interruptus protein functions and localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 2880-4.

- **S**isson, J.C., Ho, K.S., Suyama, K. and Scott, M.P. (1997) Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell*, 90, 235-45.
- **S**t-Jacques, B., Hammerschmidt, M. and McMahon, A.P. (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development*, 13, 2072-86.
- Storm, E.E. and Kingsley, D. M. (1996) Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development (Cambridge, England)*, 122, 3969-3979.
- **S**un, X., Mariani, F.V. and Martin, G.R. (2002) Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*, 418, 501-8.
- Suzuki, T., Takeuchi, J., Koshiba-Takeuchi, K. and Ogura, T. (2004) Tbx Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. *Developmental cell*, 6, 43-53.
- Svärd, J., Heby-Henricson, K., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergstrom, A., Ericson, J., Toftgard, R. and Teglund, S. (2006) Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Developmental cell*, 10, 187-97.
- Talamillo, A., Bastida, M.F., Fernandez-Teran, M. and Ros, M.A. (2005) The developing limb and the control of the number of digits. *Clinical genetics*, 67, 143-53.
- te Welscher, P., Fernandez-Teran, M., Ros, M.A. and Zeller, R. (2002) Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes & development,* 16, 421-6.
- te Welscher, P., Zuniga, A., Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H.J., Meijlink, F. and Zeller,
   R. (2002) Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science*, 298, 827-30.
- Tempe, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M.F. and Concordet, J.P. (2006) Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCFbetaTrCP. *Mol Cell Biol*, 26, 4316-26.
- Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y., Qi, Y.P., Gysin, S., Fernandez-del Castillo, C., Yajnik, V. *et al.* (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, 425, 851-6.
- Thien, H. and Rüther, U. (1999) The mouse mutation Pdn (Polydactyly Nagoya) is caused by the integration of a retrotransposon into the Gli3 gene. *Mamm Genome,* 10, 205-9.
- Thomas, M.K., Rastalsky, N., Lee, J.H. and Habener, J.F. (2000) Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 49, 2039-47.

- **T**ickle, C. (1981) The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing. *Nature*, 289, 295-8.
- Tickle, C. (2006) Making digit patterns in the vertebrate limb. Nat Rev Mol Cell Biol, 7, 45-53.
- Tole, S., Ragsdale, C.W. and Grove, E.A. (2000) Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant extra-toes(J). *Developmental biology*, 217, 254-65.
- Tumpel, S., Sanz-Ezquerro, J.J., Isaac, A., Eblaghie, M.C., Dobson, J. and Tickle, C. (2002) Regulation of Tbx3 expression by anteroposterior signalling in vertebrate limb development. *Developmental biology*, 250, 251-62.
- Ueta, E., Maekawa, M., Morimoto, I., Nanba, E. and Naruse, I. (2004) Sonic hedgehog expression in Gli3 depressed mouse embryo, Pdn/Pdn. *Congenit Anom (Kyoto),* 44, 27-32.
- van den Heuvel, M. and Ingham, P.W. (1996) smoothened encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature*, 382, 547-51.
- Varjosalo, M., Li, S.P. and Taipale, J. (2006) Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between Drosophila and mammals. *Developmental cell*, 10, 177-86.
- Verloes, A., David, A., Ngo, L. and Bottani, A. (1995) Stringent delineation of Pallister-Hall syndrome in two long surviving patients: importance of radiological anomalies of the hands. *J Med Genet*, 32, 605-11.
- Vierkotten, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B. and Rüther, U. (2007) Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development (Cambridge, England)*, 134, 2569-77.
- von Mering, C. and Basler, K. (1999) Distinct and regulated activities of human Gli proteins in Drosophila. *Curr Biol*, 9, 1319-22.
- Vortkamp, A., Franz, T., Gessler, M. and 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, 461-3.
- Vortkamp, A., Gessler, M. and Grzeschik, K.H. (1991) GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature*, 352, 539-40.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M. and Tabin, C.J. (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 273, 613-22.
- Wagner, K., Kroisel, P.M. and Rosenkranz, W. (1990) Molecular and cytogenetic analysis in two patients with microdeletions of 7p and Greig syndrome: hemizygosity for PGAM2 and TCRG genes. *Genomics*, 8, 487-91.
- Wang, B., Fallon, J.F. and Beachy, P.A. (2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb.

Cell, 100, 423-34.

- Wang, B. and Li, Y. (2006) Evidence for the direct involvement of {beta}TrCP in Gli3 protein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 33-8.
- Wang, C., Rüther, U. und Wang, B. (2007) The Shh-independent activator function of the fulllength Gli3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Developmental biology*, 350, 460-9.
- Watkins, D.N., Berman, D.M., Burkholder, S.G., Wang, B., Beachy, P.A. and Baylin, S.B. (2003) Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 422, 313-7.
- Wellik, D.M., Capecchi, M. R. (2003) Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science*, 363-367.
- Wild, A., Kalff-Suske, M., Vortkamp, A., Bornholdt, D., Konig, R. and Grzeschik, K.H. (1997)
   Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome. *Human molecular genetics*, 6, 1979-84.
- Wilson, L. and Maden, M. (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental biology*, 282, 1-13.
- Winter, R.M. and Huson, S.M. (1988) Greig cephalopolysyndactyly syndrome: a possible mouse homologue (Xt-extra toes). *Am J Med Genet*, 31, 793-8.
- Wolpert, L. (1969) Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol*, 25, 1-47.
- Wolpert, L. (1989) Positional information revisited. *Development (Cambridge, England)*, 107 Suppl, 3-12.
- Yao, H.H., Whoriskey, W. and Capel, B. (2002) Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes & development*, 16, 1433-40.
- Zakany, J., Fromental-Ramain, C., Warot, X. and Duboule, D. (1997) Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dosedependent mechanism with potential evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 13695-13700.
- Zakany, J. and Duboule, D. (1999) Hox genes in digit development and evolution. *Cell and tissue research*, 296, 19-25.
- Zakany, J., Fromental-Ramain, C., Warot, X. and Duboule, D. (1997) Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the United States of America, 94, 13695-700.
- Zakany, J., Kmita, M. and Duboule, D. (2004) A dual role for Hox genes in limb anteriorposterior asymmetry. *Science*, 304, 1669-72.

- Zhang, W., Zhao, Y., Tong, C., Wang, G., Wang, B., Jia, J. and Jiang, J. (2005) Hedgehogregulated Costal2-kinase complexes control phosphorylation and proteolytic processing of Cubitus interruptus. *Developmental cell*, 8, 267-78.
- Zhang, X.M., Ramalho-Santos, M. and McMahon, A.P. (2001) Smoothened mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. *Cell*, 105, 781-92.
- Zhu, A.J., Zheng, L., Suyama, K. and Scott, M.P. (2003) Altered localization of Drosophila Smoothened protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes & development*, 17, 1240-52.
- Zuniga, A., Haramis, A.P., McMahon, A.P. and Zeller, R. (1999) Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature*, 401, 598-602.
- Zuniga, A. and Zeller, R. (1999) Gli3 (Xt) and formin (Id) participate in the positioning of the polarising region and control of posterior limb-bud identity. *Development (Cambridge, England)*, 126, 13-21.

# 8. Danksagung

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Ulrich Rüther möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit die experimentellen Arbeiten in seinem Institut durchführen zu können, sowie für seine generelle Unterstützung und Hilfestellung während meiner Arbeit bedanken.

Univ.-Prof. Dr. Rolf Wagner danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates trotz großer Arbeitsbelastung.

Selbstverständlich danke ich allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für Entwicklungs- und Molekularbiologie für die sehr unterhaltsame, gemeinsam verbrachte Zeit, einschließlich der wöchentlichen Kuchen- und den leider nur wesentlich unregelmäßiger erfolgten Altstadtorgien.

Bei Julia Fischer und Jürgen Knobloch möchte ich mich noch einmal extra bedanken, da sie sich trotz ihrer knappen Zeit beim korrigierenden Lesen dieser Arbeit so engagiert haben.

Danken möchte ich auch der Düsseldorf Entrepreneurs Foundation, die meine Promotionsarbeit für 2.5 Jahre (01/2005-06/2007) durch ein Stipendium unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt natürlich meiner Familie, insbesondere meiner wundervollen Frau Bettina, deren Unterstützung meinen Weg wesentlich erleichtert hat.

# 9. Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation "Die molekulare Grundlage des Pallister-Hall-Syndroms" habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 24.11.2007

(Patrick Hill)