

**Molekulare Analyse des *Gli3*-Gens
in der morphogenetischen Maus-Mutante *Pdn*
(Polydactyly Nagoya)**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Biol. Hermann-Josef Thien
geboren am 29.04.1967 in Lingen/Ems

1997

Referent: Prof. Rüter
Korreferent: Prof. Jacobsen
Tag der Promotion: 4. Februar 1998

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover vorgelegte Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die erhobenen Daten wurden nicht in der Diplomarbeit verwendet.

Hannover, den 30.11.1997

Hermann Thien

Zusammenfassung

Die semidominante Maus-Mutante "Polydactyly Nagoya" (*Pdn*) trat als Spontanmutante auf und wurde hauptsächlich wegen ihre Effekte auf die Gliedmaßen- und Kopf-Strukturen beschrieben. Der Gliedmaßen-Phänotyp von *Pdn*-Mäusen ist charakterisiert durch die Bildung von zusätzlichen Fingerelementen (Polydaktylie) an der anterioren Seite der Hinterläufe. Homozygote *Pdn*-Mäuse zeigen starke skeletale Fehlbildungen, einschließlich einer Verkürzung der Tibia und einer abnormalen Ausbildung des Sternums. Im Folgenden wurden diese Mäuse auch wegen ihrer pathologischen Gehirn-Entwicklung beschrieben, die zum Fehlen des Bulbus olfactorius und zur Ex- oder Hydrozephalie führen. *Pdn* ist allelisch zur Mutante *Xt* (*Extra-toes*), bei der durch eine Deletion im *Gli3*-Gen ein mit *Pdn* weitgehend identischer Phänotyp entsteht. *Gli3* gehört zur Gli-Familie von Zink-Finger-Proteinen, die einen entscheidenden Einfluß auf die Gliedmaßenentwicklung ausüben, da sie als Effektoren des *Sonic Hedgehog*-Signaltransduktionsweges dessen Zielgene aktivieren bzw. reprimieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zuerst die Wildtyp-Sequenz der murinen *Gli3*-cDNA ermittelt und diese für einen Vergleich der genomischen Struktur von Wildtyp-*Gli3* und *Gli3^{Pdn}* zu genutzt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, ebenso wie für die *Gli3*-Expressionsstärke in +/+-, *Pdn*/+- und *Pdn*/*Pdn*-Embryonen.

In der Folge wurde die Sequenz von *Gli3^{Pdn}*-Transkripten untersucht, wobei schließlich fünf von der Wildtyp-*Gli3*-RNA abweichende Spleißvarianten detektiert werden konnten, die jeweils eine Teilsequenz eines "Early Transposon" (ETn) beinhalten. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der fünf Spleißvarianten deuten bereits darauf hin, daß die resultierenden Proteine nicht funktionell sein werden, da sie nur für rudimentäre Teile des *Gli3*-Proteins kodieren bzw. in ihrer Sekundärstruktur stark verändert sind.

Darüberhinaus wurde die *Gli3^{Pdn}*-Expression umfassend analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß die Menge an Wildtyp-RNA in homozygoten *Pdn*-Embryonen drastisch reduziert ist, so daß sie nur noch ca. 15% an der Gesamtexpression ausmacht, während 85% hybride *Gli3*/ETn-Transkripte sind. In heterozygoten Embryonen liegen die Anteile bei jeweils ca. 50%.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die phänotypische Merkmalsausprägung bei *Pdn*-Mäusen mit dem Verhältnis von Wildtyp- zu Mutantentranskripten korreliert: bei einer Relation von ca. 1:1 bleiben adulte *Pdn*/+-Tiere phänotypisch unauffällig, steigt das Verhältnis auf ca. 1:3, so wird der milde heterozygote Phänotyp sichtbar.

Die Integration eines ETn als molekulare Ursache der *Pdn*-Mutante konnte somit durch die im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse eindeutig nachgewiesen werden.

Abstract

The semidominant mouse mutant "Polydactyly Nagoya" (*Pdn*), a spontaneous mutation, was mainly described by its effects on the limb and head structures. The limb phenotype of *Pdn* mice is characterized by the formation of supernumerary digital elements (polydactyly) on the anterior side of hindlimbs. Homozygous *Pdn* mice show more severe skeletal malformations, including shortening of the tibia and abnormal formation of the sternum. More recently these mice were also described because of their abnormal brain development, leading to an absence of the olfactory lobes and exencephaly or hydrocephaly. *Pdn* is allelic to the *Xt* mutant (*Extra-toes*), in which a deletion in the *Gli3* gene leads to a phenotype that is almost identical to *Pdn*. *Gli3* belongs to the Gli family of zinc finger proteins that plays a crucial role in limb development. Its members are effectors in the Sonic Hedgehog (Shh) signal transduction pathway, activating or repressing Shh target genes.

In the course of this project the wildtype sequence of the murine *Gli3* cDNA was determined and then used for a comparison of the genomic structure of wildtype *Gli3* and *Gli3^{Pdn}*. No significant differences were found, which was also true for the *Gli3* expression level in +/+, *Pdn*/+ and *Pdn/Pdn* embryos.

Thereafter the sequence of *Gli3^{Pdn}* transcripts were analysed, whereby five splice variants differing from the wildtype *Gli3* RNA could be detected, each containing a part of the sequence of an "Early Transposon" (ETn). The deduced aminoacid sequences of the five splice variants lead to the assumption that the encoded proteins are not functional, because they are modified in their secondary structure or truncated.

Moreover the *Gli3^{Pdn}* expression was analysed in detail. Thereby it was elucidated that the amount of wildtype transcripts is reduced to about 15% in homozygous *Pdn* embryos, while about 85% of the RNA are *Gli3*/ETn transcripts. In heterozygous embryos wildtype and mutated transcripts contribute about 50% of the expression.

Finally it could be shown that the strength of the phenotype in *Pdn* mice is correlated with the ratio of wildtype to mutated transcripts: up to a ratio of about 1:1 adult *Pdn*/+ mice show no phenotype, but at a ratio of about 1:3 the mild heterozygous phenotype becomes distinct.

By the results that were obtained during this Ph.D. thesis the integration of an ETn could be proved to be the molecular origin of the *Pdn* mutant.

ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	8
1.1. GRUNDLAGEN DER GLIEDMASSENENTWICKLUNG	10
1.2. DIE MAUSMUTANTE <i>Pdn</i> (Polydactyly Nagoya)	13
1.3. DIE <i>GLI</i> -FAMILIE	15
1.4. ZIELSETZUNG	19
2. MATERIALIEN UND METHODEN	20
2.1. CHEMIKALIEN UND STANDARDLÖSUNGEN	20
2.2. ALLGEMEINE TECHNIKEN	20
2.2.1. Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	21
2.2.2. Klonierung von DNA-Fragmenten	22
2.2.3. Transformation von Plasmiden in <i>Escherichia coli</i>	23
2.2.4. Präparation von Plasmid-DNA	25
2.3. ISOLIERUNG VON DNA UND RNA	25
2.3.1. Präparation von DNA aus Organen	25
2.3.2. Präparation von DNA aus Schwanzgewebe	26
2.3.3. Parallele Aufreinigung von DNA und RNA	26
2.3.4. Präparation von RNA aus Geweben	26
2.3.5. Präparation von RNA aus Zellen in Kultur	27
2.4. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	27
2.4.1. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide ("Primer")	27
2.4.2. PCR-Amplifikation	29
2.4.3. Reverse Transkription	29
2.5. SEQUENZIERUNG	29
2.5.1. Sequenzen der verwendeten Primer	29

2.5.2. Radioaktive Sequenzierung	30
2.5.3. Fluoreszenzsequenzierung	32
2.6. HYBRIDISIERUNG	33
2.6.1. Herstellung radioaktiv markierter Sonden	33
2.6.2. Southern Blot-Analyse	33
2.6.3. Northern Blot-Analyse	34
2.6.4. Hybridisierung nach Church	34
2.6.5. RNase-Protektionsanalyse	35
2.7. ANALYSE VON cDNA-BIBLIOTHEKEN	35
2.8. ZELLKULTUR	36
2.8.1. Zelllinien	36
2.8.2. Passagieren von Zellen	37
2.9. TIEREXPERIMENTELLE VERFAHREN	37
3. ERGEBNISSE	38
3.1. UNTERSUCHUNG VON cDNA-BIBLIOTHEKEN	38
3.2. AMPLIFIKATION VON <i>Gli3</i> cDNA-FRAGMENTEN DURCH RT-PCR	38
3.3. SEQUENZVERGLEICHE MIT MITGLIEDERN DER <i>Gli</i> -FAMILIE	41
3.4. SOUTHERN BLOT-ANALYSEN GENOMISCHER DNA	45
3.5. UNTERSUCHUNG DER RNA-EXPRESSION	46
3.6. SEQUENZANALYSE DER <i>Gli3</i> -cDNA VON <i>Pdn</i> -MÄUSEN	48
3.7. MOLEKULARE ANALYSE DER MUTATIONSFOLGEN	50
Spleißvarianten	50
Expression	61
3.8. <i>Gli3</i> -EXPRESSION IN HETEROZYGOTEN <i>Pdn</i> -MÄUSEN	67
3.9. GENOMISCHE ANALYSE	69
4. DISKUSSION	71
4.1. WILDTYP-SEQUENZ DES MURINEN <i>Gli3</i>	71

Sequenzhomologien innerhalb der <i>Gli</i> -Familie	71
4.2. <i>Gli3</i>-ANALYSE IN DER <i>Pdn</i>-MUTANTE	73
Die <i>Pdn</i> -Mutante wird hervorgerufen durch die Integration eines Retrotransposons	73
<i>Gli3^{Pdn}</i> -Proteine und humane <i>GLI3</i> -Mutationen	81
4.3. EXPRESSIVITÄT DES HETROZYGOTEN PHÄNOTYPS UND <i>Gli3</i>-EXPRESSION IN <i>Pdn</i>-MÄUSEN	83
4.4. LOKALISATION DER ETn-INTEGRATION IN <i>Gli3^{PDN}</i>	85
4.5. AUSBLICK	87
LITERATURVERZEICHNIS	88
LEBENS LAUF	103

Abkürzungsverzeichnis

³² P	radioaktives Phosphorisotop der Atommasse 32
³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop der Atommasse 35
AER	apical ectodermal ridge
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
cM	centimorgan
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Gemisch aus Desoxyadenosin-, Desoxycytosin-, Desoxyguanosin- und Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MEF	mouse embryo fibroblast
MOPS	3-{N-Morpholin}propan-sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaAc	Natrium-Acetat
OD	Optische Dichte
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	Piperazin-1,4,bis-(2-ethansulfonsäure)

RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Einheit der biologischen Aktivität
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
ZPA	zone of polarizing activity

1. Einleitung

Die molekularen Grundlagen der Entwicklung von Organismen aufzuklären, ist eine der großen Herausforderungen der modernen Biologie. Um zu verstehen, welche Informationen und Prozesse für den Aufbau und die Komplexität eines Lebewesens verantwortlich sind, müssen die verantwortlichen Entwicklungskontrollgene identifiziert und ihre Funktionen charakterisiert werden. Wegen der Komplexität ihres Genoms werden solche Untersuchungen in höheren Organismen allerdings erschwert. Für das menschliche Genom wird z.B. geschätzt, daß es 60.000-100.000 Gene enthält (Fields et al., 1994). So wurden erste Erkenntnisse durch Studien an einfachen Organismen wie Bakterien oder Hefen erzielt. Bedeutender sind aber die Einsichten, die durch die systematische Analyse von Mutanten von höheren Tieren gewonnen werden konnten. Damit wurde es möglich Gene zu ermitteln, die an bestimmten physiologischen oder morphologischen Prozessen beteiligt sind: durch die Korrelation von phänotypischer und molekularer Veränderung kann auf die Funktion eines Gens geschlossen werden. Diese Strategie wurde erfolgreich in verschiedenen Spezies angewendet. Hervorzuheben sind hier u.a. die durch chemische Mutagenese erzeugten Mutationen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, wodurch eine Vielzahl von Entwicklungskontrollgenen ermittelt werden konnte (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Da sich viele der hierbei isolierten Gene als homolog in Struktur und Funktion zu Entwicklungskontrollgenen von Säugetieren erwiesen (Kessel und Gruß, 1990), hatten diese Studien auch bedeutende Auswirkungen auf das Verständnis der Entwicklung höherer Organismen. Durch ihre Homologie zu den Homeoboxgenen in *Drosophila* wurden z.B. die *Hox*-Gene gefunden. Diese in Klustern organisierten Gene sind unter anderem für die Ausbildung regionaler Strukturen entlang der anteroposterioren Körperachse und in den Extremitäten verantwortlich (Krumlauf, 1994). Zur weiteren Erforschung vertebratenspezifischer Kontrollgene dienen Mutationsanalysen des Zebrafisches (*Danio rerio*), wiederum auf der Grundlage chemischer Mutagenese (Nüsslein-Volhard, 1994). Auf Grund seiner leichten Manipulierbarkeit, der hohen Nachkommenzahl und der gut verfolgaren Embryonalentwicklung kann eine Vielzahl von Zebrafisch-Mutanten systematisch analysiert werden. Bereits die bisherigen Ergebnisse (Haffter et al., 1996) lassen erwarten, daß wegen der hohen Homologie innerhalb der Vertebraten durch die Klonierung der entsprechenden Gene wichtige neue Entwicklungskontrollgene von Säugetieren identifiziert werden können.

Weitere vielversprechende Organismen für die Identifizierung entwicklungsrelevanter Gene sind das Huhn und die Maus. Letztere ist trotz der intrauterinen Entwicklung und der vergleichsweise geringen Anzahl von Nachkommen der ideale Modellorganismus für entwicklungsbiologische Studien auf der Ebene der Säugetiere. Die Vorteile der Maus liegen u.a. in der Existenz einer Vielzahl von Inzuchtstämmen (Doolittle et al., 1996). Da

die phänotypischen Auswirkungen vieler Mutationen stark von dem jeweiligen genetischen Hintergrund beeinflusst werden, sind diese Stämme von großer Bedeutung. Bei Inzuchtstämmen ist der genetische Hintergrund weitgehend definiert, so daß die Funktion eines bestimmten Gens aus einem beobachteten Phänotyp abgeleitet werden kann. Desweiteren ist das Mausgenom physikalisch bereits relativ genau kartiert. Die Lokalisierung und Identifizierung mutierter Gene wird durch die hohe Auflösung von etwa 0.2 cM oder 400 kb (Dietrich et al., 1996) erleichtert. Und obwohl eine systematische Mutantanalyse bisher wegen des hohen Aufwandes in der Maus nicht möglich war, konnten bereits über 1000 spontane bzw. strahlungs- oder chemisch-induzierte Mutationen beschrieben werden (Bedell et al., 1997a; Doolittle et al., 1996). Zahlreiche dieser Mausmutanten dienen als erste Modelle für humane Erkrankungen, da eine Reihe biologischer Vorgänge in der Maus analog zu denen des Menschen ablaufen (Bedell et al., 1997b). Beispielsweise zeigen *lpr*-Mäuse (Murphy und Roths, 1978) Symptome, die denen der humanen Autoimmunerkrankung *Lupus erythematoses* entsprechen, während die *Xt*-Mutante ein Mausmodell für das humane *Greig Cephalopolysyndactyly Syndrom* darstellt (Hui und Joyner, 1993).

Bei spontanen und chemisch induzierten Mutationen handelt es sich meist um Punktmutationen, die nur schwer zu lokalisieren sind. Infolgedessen ist die Identifizierung oft mit einem sehr hohen Aufwand verbunden. Hingegen sind bei strahlungsinduzierten Mutationen häufig große chromosomale Bereiche von mehreren cM deletiert. Da hierbei oftmals mehrere Gene betroffen sind, wird die Analyse der molekularen Ursachen eines auftretenden Phänotyps erschwert. Deutlich einfacher und schneller können entwicklungsbiologische Prozesse analysiert werden, wenn Manipulationen an der Keimbahn der Maus vorgenommen werden:

- Erzeugung transgener Tiere durch pronukleäre Injektion von DNA (Hogan et al., 1994). Die injizierte DNA wird willkürlich in das Genom der Maus integriert. In der Folge können Auswirkungen der Überexpression oder Fehlexpression des endogenen oder mutierten Genproduktes untersucht werden.
- Insertionelle Mutagenese. Hierbei wird der Mutationsort durch die Integration der Fremd-DNA markiert, wodurch die Isolierung des mutierten Gens erleichtert wird. Zahlreiche Insertionsmutanten entstanden durch die Herstellung transgener Mäuse (Rijkers et al., 1994). Beispiele mit phänotypischen Veränderungen der Gliedmaßen sind die *Ft*-Mausmutante (van der Hoeven et al., 1994) und die *add*-Mutante, bei der das Zinkfinger-Gen *Gli3* betroffen ist (Pohl et al. 1990; s. 1.2.).
- Darüber hinaus sind Mäuse die bisher einzigen Säugetiere, bei denen endogene Gene gezielt mutiert und diese Veränderungen über die Keimbahn weitergegeben wurden. Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen ("ES-Zellen"; Robertson, 1987) werden zunächst Mutationen erzeugt. Diese ES-Zellen können dann

nach Injektion in Blastozysten zu allen Geweben einschließlich der Keimbahn beitragen (Hogan et al., 1994). Auf diese Weise können Gene, die zumindest teilweise bekannt sind, gezielt und vollständig inaktiviert werden. Beispielsweise wurde die Funktion der *Hox*-Gene bei der Ausbildung regionaler Spezifität durch solche Inaktivierungsexperimente ("knock-out") gezeigt (McGinnis und Krumlauf, 1992). Andererseits können Fremd-Gene unter die Kontrolle der regulatorischen Elemente des mutierten Gens gebracht werden ("knock-in"), um die Auswirkung einer Fehl- oder Überexpression zu untersuchen. Desweiteren ist es möglich, ein Reporter-Gen (z.B. *lacZ*) einzubringen, so daß die Aktivität des mutierten Gens durch die Expression des Fusionsproteins sichtbar gemacht werden kann (Capecchi, 1989a und b; Joyner, 1993). Eine weitere Optimierung dieser Methode ist durch die Verwendung des viralen *Cre/loxP*-Systems möglich (Jiang und Gridley, 1997). Durch die hohe Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Systems sind Genmanipulationen gezielt gewebespezifisch oder zu einem definierten Entwicklungszeitpunkt möglich (Kühn et al., 1995). Auch die Umordnung von Chromosomenabschnitten läßt sich damit durchführen (Ramirez-Solis et al., 1995).

Durch die beschriebenen Methoden ist einerseits die Identifizierung von weiteren Entwicklungskontrollgenen zu erwarten, andererseits werden neue Erkenntnisse über die Funktion und Regulation von entwicklungsrelevanten Genen gewonnen. Zusammen werden diese Daten zur Aufklärung der Vorgänge bei der Ontogenese tierischer Organismen beitragen.

1.1. GRUNDLAGEN DER GLIEDMASSENENTWICKLUNG

Die Gliedmaßenentwicklung ist ein klassisches Modellsystem um grundlegende entwicklungsbiologische Fragestellungen zu untersuchen. Aus diesem Grund sind Mutanten mit phänotypischen Veränderungen der Gliedmaßen besonders interessant.

Die Entwicklung der Gliedmaßen der Vertebraten beginnt mit der Spezifikation ihrer Position und Polarität und der Initiation der sogenannten Gliedmaßenknospen ("limb bud"). Bei den meisten Vertebraten entstehen die Gliedmaßen als zwei Paare von Knospen aus dem sich verdickenden lateralen Plattenmesoderm am cervical-thorakalen und am lumbosakralen Übergang der primären Körperachse. Epithelial-mesenchymale Interaktionen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Während der frühen Stadien der Entwicklung induziert das Mesenchym in der darüberliegenden ektodermalen Schicht eine Zellproliferation. Diese morphologisch deutliche Verdickung wird als AER ("apical ectodermal ridge") bezeichnet (Saunders et al., 1957). Die weiteren Interaktionen zwischen AER und dem darunterliegenden Mesenchym initiieren das Auswachsen und die Musterbildung der Gliedmaßenknospen und erhalten diese Vorgänge aufrecht.

Zur Entwicklung der proximodistalen Achse tragen die Zellen des AER bei, indem sie in der sogenannten Progreßzone direkt unterhalb des AER die Proliferation der mesodermalen Zellen induzieren und ihre Differenzierung verhindern. Durch das distale Wachstum gelangen proximal gelegene mesodermale Zellen aus der Progreßzone heraus und differenzieren, wodurch sich folglich zunächst proximale, dann distale Strukturen ausbilden (Summerbell et al., 1973). Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, daß die Induktion der Gliedmaßenknospe wie auch die Proliferation der mesodermalen Zellen von Mitgliedern der Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren (Fgf) beeinflusst werden. Während *Fgf-2*, *-4* und *-8* im AER exprimiert werden und dieses funktionell ersetzen können (Niswander et al., 1993; Fallon et al., 1994; Crossley et al., 1996; Vogel et al., 1996) ist *Fgf-10* wahrscheinlich der polarisierende Faktor bei der Initiation der Gliedmaßenentwicklung im lateralen Plattenmesoderm (Ohuchi et al., 1997). Zudem wird es in der Progreßzone exprimiert und ist dort möglicherweise für die Wechselwirkungen mit dem AER verantwortlich.

Auch die Musterbildung entlang der anteroposterioren Achse wird durch das AER beeinflusst. Die Aufrechterhaltung des Musterbildungszentrums im posterioren Mesenchym, der sogenannten ZPA ("zone of polarizing activity"), scheint von der *Fgf-4*-Expression im AER abzuhängen. Die ZPA enthält essentielle Informationen für die Ausbildung der anteroposterioren Polarität der Gliedmaßen (Saunders und Reuss, 1974). Die Transplantation einer zweiten ZPA in die anteriore Seite von Gliedmaßenknospen führt zu einer spiegelbildlichen Verdoppelung der Gliedmaßen (Saunders und Gasseling, 1968). Für die Funktion der ZPA wird das sezernierte Protein Sonic hedgehog (*Shh*) verantwortlich gemacht: die Expression von *Shh* überlappt mit der Region der ZPA und die ektopische Expression von *Shh* auf der anterioren Seite der Gliedmaßenknospe allein genügt, um eine polarisierende Aktivität hervorzurufen (Riddle et al., 1993). Zwischen *Fgf-4* und *Shh* existiert eine Rückkoppelung, da die *Fgf-4*-Expression wiederum durch *Shh* reguliert wird (Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1994). Eine solche gegenseitige Beeinflussung wird auch für *Fgf-10* und *Shh* diskutiert (Ohuchi et al., 1997).

Bei der Wirkungsweise von *Shh* wird von einem Morphogengradienten (Wolpert, 1969) ausgegangen, wodurch untergeordnete Gene, wie z.B. die *Hox*-Gene, differentiell reguliert werden (Graham, 1994). In der Folge führt dies zur Ausbildung der unterschiedlichen Strukturen der anteroposterioren Achse (Duboule, 1994).

Wie bereits oben erwähnt, führt die ektopische Expression von *Shh* im anterioren Bereich zu Polydaktylien, wofür Mausmutanten beschrieben wurden (*Recombination induced mutant 4 (Rim4)*, *Strong's Luxoid (Ist^D)*; Masuya et al., 1995, 1997). Eine solche ektopische *Shh*-Expression im anterioren Bereich kann beispielsweise durch den Ausfall der *Gli3*-Expression hervorgerufen werden (Masuya et al., 1997; Büscher et al., 1997a), auch hierfür sind Mausmutanten bekannt (*Extra-toes (Xt)*, *Hemimelic-extra toes (Hx)*). *Gli3*

gehört zur *Gli*-Familie von Zink-Finger-Genen, die im Detail unter 1.3. beschrieben ist. Auch auf die *Shh*-Signalkaskade wird dort näher eingegangen.

Für den Erhalt der *Shh*-Expression in der ZPA wird darüberhinaus ein Signal aus dem dorsalen Ektoderm benötigt. Diese Funktion wird von *Wnt7a* erfüllt, einem Mitglied der *Wg*-Familie ("wingless") von sezernierten Signalmolekülen (Yang und Niswander, 1995). *Wnt7a* ist außerdem mitverantwortlich für die normale Ausbildung der dorsoventralen Achse, da die Inaktivierung von *Wnt7a* zu einer Ventralisierung der Gliedmaßen führt (Parr und McMahon, 1995). Ein Zielgen von *Wnt7a* bei der Ausbildung dorsaler Strukturen ist *Lmx1*, das im dorsalen Mesoderm exprimiert wird (Riddle et al., 1995; Vogel et al., 1995). Im ventralen Ektoderm wird hingegen eine Expression von *Engrailed-1* (*En-1*) gefunden. *En-1*^{-/-}-Mäuse zeigen eine Dorsalisierung der Gliedmaßen, woraus eine ventralisierende Funktion abgeleitet wurde (Loomis et al., 1996). Diese Tiere zeigen zudem ventral ausgedehnte und abgeflachte AERs, so daß daraus auf eine Beteiligung von *En-1* bei der Regulation der AER-Ausbildung geschlossen wurde. In neueren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß *En-1* die Expression von *Radical fringe* im dorsalen Ektoderm reprimiert (Laufer et al., 1997; Rodriguez-Esteban et al., 1997). Da sich das AER an der Grenze von *Radical fringe* exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen ausbildet, wurde somit eine indirekte Beteiligung von *En-1* bei der Positionierung des AER bestätigt.

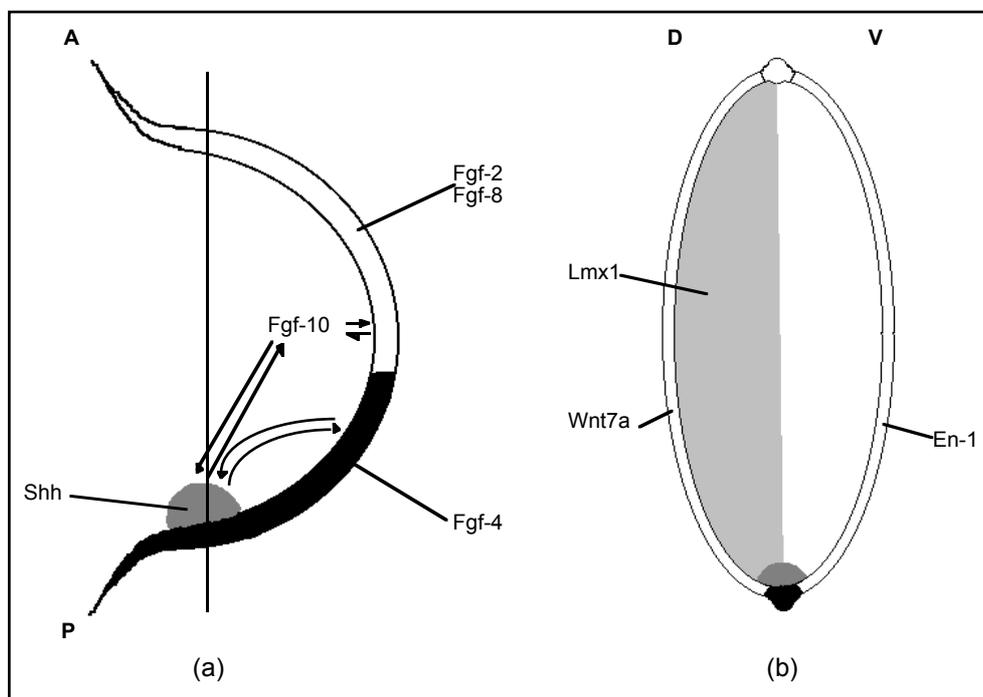


Abb. 1.1.1: Schematische Darstellung der Expressionsdomänen einiger an der Gliedmaßenentwicklung der Vertebraten beteiligter Faktoren. Abgebildet sind Gliedmaßenknospen in dorsaler (a) und lateraler Ansicht (b). Die sagittale Schnittebene der Darstellung (b) ist in (a) angedeutet. Die Interaktionen der Faktoren sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Fgf = "Fibroblast growth factor", Shh = Sonic hedgehog, En = Engrailed.

Die Expressionsdomänen der aufgeführten Faktoren sind in Abb. 1.1.1 zusammengefaßt. Schon diese vereinfachte Darstellung zeigt, daß die bei der Gliedmaßenentwicklung ablaufenden Prozesse wie die Regulation der Proliferation durch das AER, die Musterbildung und die Entwicklung der axialen Asymmetrien nicht isoliert betrachtet werden können, sondern sich gegenseitig beeinflussen, voneinander abhängen und als Netzwerk anzusehen sind.

Für die Ausbildung der unterschiedlichen Strukturen der Gliedmaßen muß zusätzlich noch eine exaktere regionale Spezifizierung erfolgen (Tickle, 1995). Wie dies konkret geschieht ist noch weitgehend unbekannt. Die Entwicklung der Phalangen am distalen Ende (Autopod) der Gliedmaßen kann aber als Beispiel für einen solchen Prozeß dienen. Die späteren Finger bzw. Zehen entstehen als chondrogene Kondensationen von mesenchymalen Zellen, die die Progreßzone verlassen und differenzieren. Diese knorpeligen Phalangealanlagen werden schließlich durch endochondrale Ossifikation zu einer knöchernen Struktur transformiert. Die Modellierung der einzelnen Finger bzw. Zehen geschieht dabei durch programmierten Zelltod, bei dem die mesenchymalen Zellen des interdigitalen Bereichs absterben (Garcia-Martinez et al., 1993; Zakeri et al., 1994). Während die zellulären Vorgänge dieser Prozesse bereits beschrieben sind, ist über die molekulare Regulation wenig bekannt. Beteiligt daran ist aber die Familie der "bone morphogenetic proteins" (Bmp). *Bmp-2*, *-4* und *-7* werden vor und während des Zelltods im interdigitalen Mesoderm exprimiert und sind dort möglicherweise an der Auslösung und Kontrolle der Apoptose beteiligt (Ganan et al., 1996; Macias et al., 1997).

1.2. DIE MAUSMUTANTE *Pdn* (Polydactyly Nagoya)

Die Maus-Mutante Polydactyly Nagoya (*Pdn*) trat als Spontanmutante auf und wurde zuerst 1980 beschrieben (Hayasaka et al., 1980). Gekennzeichnet ist sie durch Veränderungen an Gliedmaßen- und Kopf-Strukturen. Der Gliedmaßen-Phänotyp von *Pdn*-Mäusen ist charakterisiert durch die Bildung von zusätzlichen Fingerelementen (Polydactylie) an der anterioren Seite der Vorder- und Hinterläufe. Da es sich bei *Pdn* um eine semidominante Mutante handelt, ist der Effekt bei *Pdn/Pdn*-Tieren stärker als bei *Pdn/+*-Mäusen: erstere zeigen an allen Extremitäten bis zu 8 Fingern, bei letzteren findet sich nur an den Hinterläufen der Ansatz eines weiteren Fingerelements. Homozygote *Pdn*-Mäuse zeigen zudem weitere skeletale Fehlbildungen. Dazu gehören eine Verkürzung der Tibia (Hemimelie) und eine abnormale Ausbildung des Sternums. In der Folge wurde bei *Pdn/Pdn*-Tieren auch eine abnormale Gehirnentwicklung beschrieben (Naruse et al., 1990). Diese führt zum Fehlen des Bulbus olfactorius und zur Ex- oder Hydrozephalie. Homozygote *Pdn*-Mäuse sind daher nicht lebensfähig und sterben kurz nach der Geburt.

Pdn wurde im 'beige'-Locus auf Chromosom 13 lokalisiert (Oda et al., 1982). Drei weitere, unabhängig entstandene Maus-Mutanten wurden ebenfalls in dieser Region kartiert: *Xt^H*,

Xt^J (*Extra-toes*) und *add* (*anterior digitpattern deformity*). Die beiden *Xt*-Allele zeigen einen Phänotyp, der nahezu identisch mit dem von *Pdn*-Tieren ist (Johnson, 1967; Hui und Joyner, 1993). Die geringen phänotypischen Abweichungen wurden auf unterschiedliche genetische Hintergründe zurückgeführt (Schimmang et al., 1994).

Die *add*-Mutante entstand durch Insertionsmutagenese (Pohl et al., 1990). Bei dieser rezessiven Mutante zeigen nur homozygote Tiere Veränderungen des anterioren Teils der Vorderläufe. Es kommt bei ihnen zu einer Verlängerung des Daumens, der in Wildtyp-Mäusen nur rudimentär angelegt ist. Dieser veränderte Daumen ist bei einigen Tieren durch Gewebe mit der zweiten Zehe verbunden. *add*-Mäuse zeigen somit einen deutlich schwächeren Phänotyp als die allelischen Mausmutanten.

Für die *Xt*-Mutante wurde nach morphologischen und genetischen Analysen zudem gefolgert, daß sie als Mausmodell für das humane *Greig Cephalopolysyndactyly Syndrom* (GCPS) dienen kann (Winter und Huson, 1988; Vortkamp et al., 1991, 1992; Schimmang et al., 1992; Hui und Joyner, 1993). Dabei handelt es sich um eine autosomale Mutation, die die cranofaciale und Gliedmaßen-Entwicklung betrifft (Greig, 1926), wobei der Phänotyp starke Ähnlichkeit mit dem von *Xt*-Mäusen besitzt. Weitere Analysen ergaben, daß bei GCPS-Patienten das Zink-Finger-Gen *GLI3* (Chromosom 7p13) durch Deletionen oder Translokationen mutiert ist (Wagner et al., 1990; Vortkamp et al., 1991). In der Folge konnte nachgewiesen werden, daß die Expression des *Gli3*-Gens in *Xt*-Mäusen aufgrund von Deletionen reduziert ist (Schimmang et al., 1992; Hui und Joyner, 1993). Die *add*-Mutation konnte im 5'-Bereich des *Gli3*-Gens lokalisiert werden, als Resultat wurde ein reduziertes Expressionsniveau ermittelt (van der Hoeven et al., 1993). Die Ergebnisse der Analysen von DNA-Struktur und Expression des *Gli3*-Gens in den vier Mutanten ist in Abb. 1.2.1 zusammengefaßt, die *Gli*-Genfamilie ist unter 1.3. beschrieben.

	Xt^H	Xt^J	<i>add</i>	<i>Pdn</i>
DNA-Struktur	Deletion des Promoters und der 5' codierenden Region	5'-Ende der Deletion im 1. Zink-Finger, 3'-Ende unbekannt	Transgen-Insertion in oder nahe Promoter	?
Expression	Null-Mutation; $Xt^H/+$: ca. 50%, Xt^H/Xt^H : 0% der Wildtyp-Menge	stark verkürztes Transkript; $Xt^J/+$: ca. 50%, Xt^J/Xt^J : 0% der Wildtyp-Menge	Reduziertes Expressionsniveau der <i>Gli3</i> -RNA; <i>addladd</i> : ca. 50% der Wildtyp-Menge	Expressionsstärke der <i>Gli3</i> -RNA unverändert

Abb. 1.2.1: *Gli3*-Expression und DNA-Struktur der unterschiedlichen Mausmutanten. Bei den beiden *Xt*-Allelen handelt es sich um Deletionen, die jeweils zu Null-Mutationen führen. Während die Insertion eines Transgens bei *add*-Mäusen zu einem reduzierten Expressionsniveau führt, war die Mutation der *Pdn*-Tiere unbekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit ermittelt werden. Erste Daten zur Expression waren aber bereits ermittelt worden (Schimmang et al., 1994).

Die für den *Pdn*-Phänotyp verantwortliche Mutation war bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit unbekannt. Bei den bis dahin durchgeführten Analysen der DNA-Struktur waren keine Hinweise auf Deletionen, Rearrangements und Punktmutationen gefunden worden, da keine Restriktionslängenpolymorphismen detektiert wurden (Schimmang et al., 1994). Die Expressionsstärke der *Gli3*-RNA wies keinen signifikanten Unterschied zwischen *+/+*, *Pdn/+* und *Pdn/Pdn*-Tieren auf. Andererseits deuteten die phänotypischen Übereinstimmungen auf eine weitere Null-Mutation des *Gli3*-Gens im *Pdn*-Locus hin. Wie für heterozygote *Xt*-Tiere beschrieben (Schimmang et al., 1992), wird der semidominante Gliedmaßenphänotyp von *Pdn/+*-Tieren möglicherweise ebenfalls durch Haploinsuffizienz verursacht, hervorgerufen durch die reduzierte Expression eines funktionalen Proteins.

1.3. DIE *GLI*-FAMILIE

Das C₂H₂-Zink-Finger-Motif, das zuerst im Transkriptionsfaktor TFIIIA beschrieben wurde (Brown et al., 1985; Miller et al., 1985), definiert eine große Superfamilie von DNA-bindenden Proteinen. Eine jeweils kleine Zahl dieser Polypeptide konstituiert eine evolutionär hochkonservierte Subfamilie, deren Mitglieder ein charakteristisches Muster von Zink-Fingern mit identischen DNA-Erkennungssequenzen besitzen. Für eine Reihe dieser Zink-Finger-Proteine wurden wichtige regulatorische Funktionen in der Embryogenese und Zelldifferenzierung beschrieben (Übersicht in: Pieler und Bellefroid, 1994).

Eine Subfamilie besteht z.B. aus den mit *Krüppel* verwandten Genen (Ruppert et al., 1988; Kinzler und Vogelstein, 1990). *Krüppel*, das zur Gap-Klasse der Segmentationsgene gehört, ist u.a. an der Entwicklung der Imaginalscheiben in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beteiligt. Auch die *Gli*-Subfamilie wird durch ihre fünf Zink-Finger und deren charakteristische Sequenzeigenschaften definiert. Das erste Mitglied dieser Gruppe wurde als Onkogen identifiziert, das in verschiedenen humanen Tumoren amplifiziert ist (Kinzler et al., 1988; Roberts et al., 1989). Da zuerst für ein Gliom beschrieben, wurde es "*Gli*" benannt. Um Mißverständnisse zu vermeiden wird es hier im folgenden als *Gli1* bezeichnet. Zwei weitere, strukturverwandte *Gli*-Typ Proteine, *Gli2* und *Gli3*, wurden kurze Zeit später isoliert (Ruppert et al., 1988). Vergleichende Proteinsequenzanalysen der bislang untersuchten *Gli*-Familienmitglieder aus Frosch, Maus und Mensch haben sieben Regionen (incl. des Zink-Finger-Bereiches) aufgezeigt, die stark konserviert sind (Ruppert et al., 1990; Marine et al., 1997). Die *Gli3*-Proteine besitzen zudem drei weitere hochkonservierte Regionen, die auch im *Drosophila*-Protein Ci (s.u.) vorkommen.

Die Expressionsmuster von *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* in der Maus wurden systematisch analysiert (Schimmang et al., 1992; Walterhouse et al., 1993; Hui und Joyner, 1993; Hui et al., 1994). In der Embryogenese wurde die Expression der drei *Gli*-Gene zuerst während der Gastrulation in Ektoderm und Mesoderm gefunden, nicht aber im Endoderm. Später

werden sie im Neuralrohr, in den sich entwickelnden Somiten und den Gliedmaßen exprimiert, in denen Shh ein entscheidendes induktives Signal darstellt. Während der Skeletogenese wird die Expression von *Gli1* im kondensierenden Mesenchym (Blastem) gefunden und ist nachfolgend auf das Perichondrium beschränkt. *Gli2* und *Gli3* werden sowohl im undifferenzierten Mesenchym coexprimiert als auch später im differenzierenden Mesenchym, das das Blastem umgibt. Alle drei *Gli*-Gene werden zudem in den Derivaten der Neuralleistenzellen und im Gesichtsskelett exprimiert. Nach Abschluß der Organogenese konnten *Gli*-Transkripte nicht mehr detektiert werden. Übereinstimmend mit den Expressionscharakteristika zeigen *Gli3*-mutante Mäuse Defekte in vom Mesoderm- und Ektoderm abgeleiteten Geweben (s.o.).

Die Mitglieder der *Gli*-Familie weisen die gleiche DNA-Bindungsspezifität zu einer kanonischen Nonamersequenz (GACCACCCA) auf (Kinzler und Vogelstein, 1990; Vortkamp et al., 1995). Mittels dieser Bindungseigenschaft konnte auch die Kristallstruktur des GLI-Zink-Finger/DNA-Komplexes aufgelöst werden (Pavletich und Pabo, 1993). Dabei zeigte der Zink-Finger 1 überraschenderweise keine DNA-Wechselwirkungen, sondern intensive Protein-Protein-Kontakte mit Zink-Finger 2. Die Zink-Finger 2-5 passen jeweils in eine große Grube der DNA und hüllen eine vollständige helikale Windung der DNA ein. Während die Zink-Finger 2 und 3 aber nur Kontakte mit dem DNA-Rückgrat ausbilden, sind die Finger 4 und 5 für die Erkennung der Nonamersequenz verantwortlich. Durch diese Daten wurde die Annahme bestätigt, daß die Gene der *Gli*-Familie für Transkriptionsfaktoren kodieren (Kinzler and Vogelstein, 1990; Ruppert et al., 1990; Vortkamp et al., 1991; Walterhouse et al., 1993).

Neuere Untersuchungen tragen zur Klärung der Frage nach der Funktion der *Gli*-Familie bei. Da das *Gli*-Homolog in *Drosophila*, *Cubitus interruptus* (*Ci*; Orenic et al., 1990), an der *Hedgehog* (*Hh*)-Signalkaskade beteiligt ist, wurde eine Beteiligung der *Gli*-Familie an der *Shh*-Signalkaskade in Vertebraten wahrscheinlich. In der *Drosophila*-Flügelentwicklung beginnt die Hh-Signaltransduktion (Übersicht in: Ruiz i Altaba, 1997) mit der Bindung des sezernierten Hh-Proteins an das Transmembranprotein Patched (*Ptc*). Durch diese Bindung wird die standardmäßige Inhibition von Smoothened (*Smo*), das mit *Ptc* einen Rezeptorkomplex bildet, aufgehoben. Die Transduktion dieses Signals in den Zellkern wird nun durch *Ci* ausgeführt. Dabei wirken auf *Ci* die Serin-Threonin-Kinase Fused (*Fu*) aktivierend, das Mikrotubuli-bindende Protein Costal 2 (*Cos2*) und die cAMP-abhängige Protein-Kinase A (PKA) hingegen reprimierend ein. Der Endeffekt ist die Beeinflussung der Regulation von Hh-Zielgenen durch den Transkriptionsfaktor *Ci*. Zielgene sind u.a. wahrscheinlich *Hh* selbst, *Ptc*, *Wingless* (*Wg*) und *Decapentaplegic* (*Dpp*). Der Hh/Shh-Signaltransduktionsweg ist in Abb. 1.3.1 dargestellt.

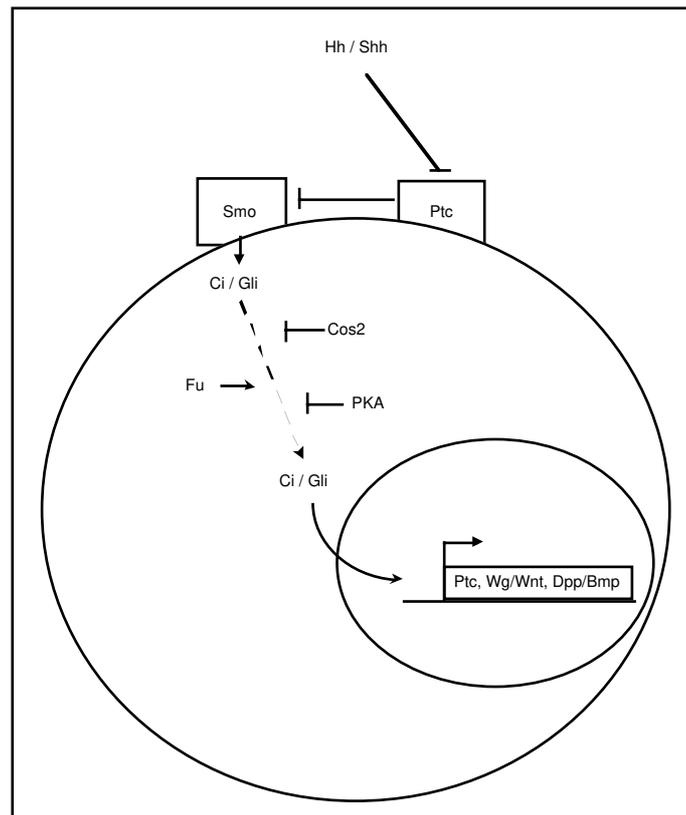


Abb. 1.3.1: Hh/Shh-Signaltransduktionskaskade. Hh = Hedgehog, Shh = Sonic Hedgehog, Ptc = Patched, Smo = Smoothened, Ci = Cubitus interruptus, Cos2 = Costal 2, Fu = Fused, PKA = Protein Kinase A, Wg = Wingless, Dpp = Decapentaplegic, Bmp = "Bone morphogenetic proteins". Hh/Shh (Drosophila/Vertebraten) bindet an Ptc und beendet damit die Repression von Smo. Ci in *Drosophila* bzw. die Gli-Proteine der Vertebraten übermitteln dieses Signal in den Zellkern, wobei sie von Fu, Cos2 und PKA beeinflusst werden. Im Zellkern werden durch die Transkriptionsfaktoren Ci/Gli Zielgene von Hh/Shh reguliert.

In Vertebraten wird die Rolle von Ci durch drei Gli-Proteine übernommen. Zur Aufklärung der jeweiligen Funktion von Gli1, Gli2 und Gli3 sind mittlerweile eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden. Bei der Entwicklung des Neuralrohrs im Frosch konnte gezeigt werden, daß die ektopische Injektion von Shh zu einer ektopischen Expression von *Gli1* führt. Die induzierende Wirkung von Shh konnte zudem auf die Aktivierung von Zielgenen durch Gli1 zurückgeführt werden (Lee et al., 1997). Unter Verwendung eines *HNF-3 β* -Enhancers, der die kanonische Gli-Bindungssequenz beinhaltet, konnte die aktivierende Eigenschaft von Gli1 *in vitro* bestätigt werden. Für Gli3 wurde hierbei hingegen eine reprimierende Wirkung nachgewiesen (Sasaki et al., 1997). Durch Untersuchungen im Huhn und im Frosch konnten diese Daten weiter erhärtet werden (Marigo et al., 1996; Marine et al., 1997). Im Huhn konnte zudem unter Verwendung eines Fusionsproteins von Gli1-Zink-Finger- und VP16 Transaktivatordomäne eine ektopische Induktion von Ptc ermittelt werden. Eine die Shh-Expressionsdomäne umgebende Koexpression von *Ptc* und *Gli1* konnte durch *in situ*-Hybridisierungen auch in der Maus gezeigt werden (Büscher et al., 1997b; Platt et al., 1997).

Für *Gli2* konnte bislang keine eindeutige Funktion gezeigt werden. Die bisherigen Daten deuten für *Gli2* und *Gli3* auf eine funktionelle Redundanz hin. So zeigen *Gli2*^{-/-}-Mäuse phänotypische Veränderungen des Gesichtsschädels (Kiefer, Schneidezähne) und eine Verkürzung des Sternums und der Röhrenknochen der Gliedmaßen (Mo et al., 1997), eine Kreuzung dieser Tiere mit der *Xt*-Mausmutante erbrachte einen synergistischen Effekt der Einzelmutationen am Skelett-Phänotyp.

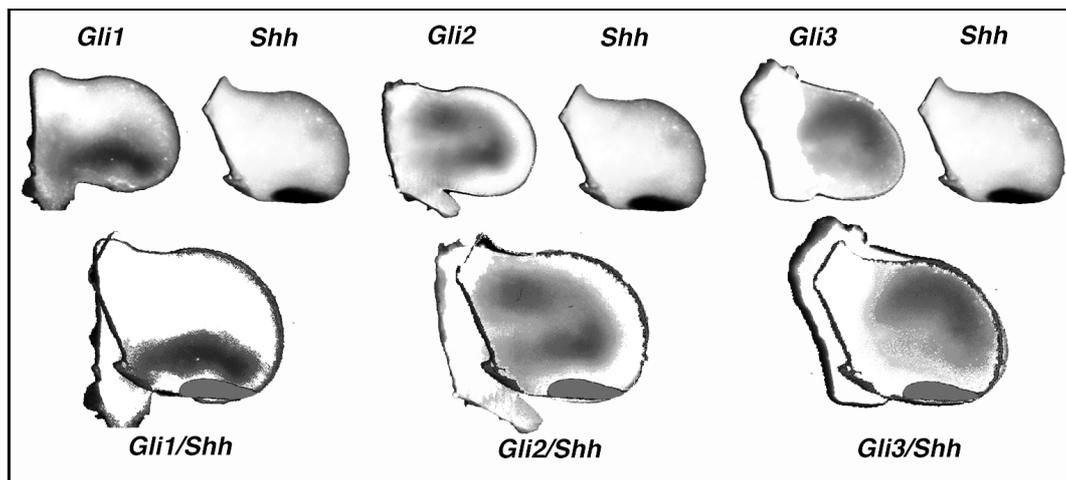


Abb. 1.3.2: Expressionsdomänen von *Shh*, *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* in Gliedmaßenknospen von Wildtyp-Mäusen (aus: Büscher et al., 1997b). Im unteren Teil ist jeweils das Resultat einer *in situ*-Hybridisierung mit *Shh* und der eines *Gli*-Gens graphisch überlagert. Während die *Gli1*-Domäne die von *Shh* umgibt, zeigt *Gli2* eine mehr zentral-proximale und *Gli3* eine anteriore Expression.

Wie bereits oben erwähnt führt die ektopische Expression von *Shh* im anterioren Bereich der Gliedmaßenknospe zu Polydaktylien. In der bereits beschriebenen *Xt*⁻-Mutante kann aufgrund einer Deletion kein Wildtyp-*Gli3*-Protein produziert werden. Hier kommt es zur Ausbildung einer ektopischen *Shh*-Domäne im anterioren Bereich (Büscher et al., 1997a; Masuya et al., 1997). In der Folge führt diese zweite ZPA zur Ausbildung des polydaktylen Phänotyps der *Xt*⁻-Mutante. Auf Grund der normalen Expressionsdomänen von *Shh* und *Gli3* (s. Abb. 1.3.2) und der Entstehung einer zweiten ZPA bei Ausfall der *Gli3*-Expression wurde postuliert, daß *Gli3* einen negativen Einfluß auf *Shh* hat und dessen Expression im anterioren Bereich bei der normalen Gliedmaßenentwicklung verhindert (Büscher et al., 1997b). Zugleich wurde aber im Huhn gezeigt, daß die Überexpression von *Shh* zu einer Repression der *Gli3*-Expression führt (Marigo et al., 1996). Zusammenfassend kann damit festgestellt werden, daß zwischen *Gli3* und *Shh* wechselseitig reprimierende Interaktionen existieren, die zu sich gegenseitig ausschließenden Expressionsdomänen führen. *Gli1* hingegen wird von *Shh* positiv reguliert und dient als Aktivator von *Shh*-Zielgenen, eine Funktion, die wiederum durch *Gli3* inhibiert wird.

Insgesamt zeigt sich eine Konservierung der Hh-Signalkaskade zwischen Insekten und Vertebraten. Die Funktionen von Ci als Aktivator und Repressor von Hh-Zielgenen ist bei Vertebraten jedoch auf verschiedene Mitglieder der *Gli*-Familie aufgeteilt worden.

Es ist denkbar, daß auch die bei der Regulation der Transkription beteiligten Cofaktoren zwischen Insekten und Vertebraten erhalten geblieben sind. Das humane Rubinstein-Taybi-Syndrom (RTS), bei dem ähnliche Phänotypen auftreten wie beim oben beschriebenen GCPS-Syndrom, bei dem das *GLI3*-Gen mutiert ist, konnte nach genauer Lokalisation dem CBP-Gen ("CREB binding protein") zugeordnet werden (Petrij et al., 1995). CBP gehört zur Gruppe der sogenannten "Bridging-Proteine". Diese können selbst keine spezifischen DNA-Bindungen eingehen, durch Protein-Protein-Interaktion mit bestimmten Transkriptionsfaktoren ist aber die Bildung von stabilen Komplexen mit der basalen Transkriptionsmaschinerie möglich (Janknecht und Hunter, 1996). Berücksichtigt man die Ähnlichkeit der Phänotypen von RTS und GCPS und die entsprechenden Mutationen in CBP bzw. *GLI3*, liegt die Frage nahe, ob Gli3 und CBP gemeinsam bei der Regulation von Shh-Zielgenen agieren. Tatsächlich konnte kürzlich für *Drosophila* eine Koaktivierung von Ci durch CBP gezeigt werden (Akimaru et al., 1997). Dabei wurde eine Phosphorylierungs-unabhängige Interaktion von CBP mit der C-terminalen Region von Ci nachgewiesen. Weitere Analysen werden aber noch bestätigen müssen, daß *in vivo* funktionale Beziehungen zwischen Ci/CBP bzw. Gli/CBP bei der Transkriptionsregulation bestehen.

1.4. ZIELSETZUNG

Bei keiner der bekannten *Gli3*-Mausmutanten war bis zu Beginn dieser Arbeit eine genaue Definition der Mutation erfolgt. Neben den *Xt*-Allelen, bei denen es sich um Deletionen handelt, und der Insertionsmutante *add* stellt die *Pdn*-Mutante in gewisser Weise eine Besonderheit dar: im Gegensatz zu *Xt*- und *add*-Tieren zeigt *Pdn*-Mäuse eine unveränderte Stärke der *Gli3*-Expression.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Mutation von *Gli3* in *Pdn* analysiert werden. Desweiteren wurde angestrebt, die Auswirkung der Mutation auf RNA und Protein aufzuklären.

Dazu mußte zunächst auf der Basis der bereits vorhandenen partiellen cDNA-Informationen die Sequenz der murinen Wildtyp-*Gli3*-cDNA ermittelt werden. Mit diesen neuen cDNA-Bereichen sollte dann eine Southern Blot-Analyse genomischer DNA von Wildtyp- und *Pdn*-Mäusen durchgeführt werden, um nochmals größere Veränderungen der genomischen DNA auszuschließen.

In der Folge sollte die Mutation von *Gli3* in *Pdn* ermittelt werden. Dazu mußte eine exakte Sequenzanalyse der *Gli3*-cDNA von *Pdn*-Mäusen erfolgen, um diese mit der Wildtyp-Sequenz zu vergleichen.

Nach der Detektion sollte schließlich die Frage adressiert werden, wie die Mutation die Expression eines funktionellen Proteins beeinflusst.

2. Materialien und Methoden

2.1. CHEMIKALIEN UND STANDARDLÖSUNGEN

Chemikalien von den Firmen Applichem, Merck und Riedel de Haen bezogen, wenn nicht anders erwähnt.

Verwendete Standardlösungen setzten sich wie folgt zusammen (Wasser jeweils aus hausinterner Millipore-Anlage):

Church-Puffer	0.25 M Na ₂ HPO ₄ , pH7.2, 7% SDS, 1 mM EDTA
Denaturierungslösung	1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
HEPES	0.67 mM KCl, 0.142 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7.3
LB	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, autoklaviert
PBS	0.016 M Na ₂ HPO ₄ , 0.04 M NaH ₂ PO ₄ , 0.15 M NaCl, pH 7.2
SOC	2% Trypton, 5% Hefe-Extrakt, 0.5% NaCl, autoklaviert, anschließend 20 mM Glukose zugeben
TAE	40 mM TRIS/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.2
TE	10 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4
Waschpuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH7.2, 0.5% SDS
10x TBE	0.9 M TRIS, 0.89 M Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8.3
20x SSC	3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat, pH 7.0

Spezielle Chemikalien und Lösungen werden bei den einzelnen Methoden beschrieben.

2.2. ALLGEMEINE TECHNIKEN

Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Vor einer Äthanol-fällung von DNA wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um Proteine aus der Nukleinsäure-Lösung zu entfernen.

Die Probe wurde dazu mit einem gleichen Volumen Phenol (TE-gesättigt) versetzt, gemischt und 2 min bei 12000 upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13). Die obere, wässrige Phase wurde mit einer Pipette abgenommen ohne Teile der organischen Phase zu verschleppen und in ein neues Gefäß überführt. Ein gleiches Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) wurde hinzugegeben, wiederum gemischt, 2 min bei 12000 x g zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt.

Äthanol-Präzipitation von DNA

Dazu wurde einem bekannten Volumen einer DNA-Probe 1/10 des Volumens an 3 M NaAc-Lösung zugesetzt und der Ansatz gemischt. Danach wurden 2.5 Volumen eiskalter 96%iger Äthanol zugegeben und erneut gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min bei -80°C gefällt und anschließend für 30 min bei 4°C und 12000 upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, das Präzipitat mit 1 ml 70%igem Äthanol gewaschen und dann erneut 5 min zentrifugiert. Wiederum wurde der Alkohol verworfen, das Präzipitat luftgetrocknet und anschließend im gewünschten Volumen TE pH 8.0 oder H₂O resuspendiert.

Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Enzyme und Puffersysteme wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Boehringer Mannheim bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Pro µg DNA wurde für die Spaltung eine Enzymaktivität von 1-10 U in 1x Enzympuffer eingesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Die Restriktionsenzyme mußten vor Ligationsreaktionen inaktiviert werden. Bei Vektoren wurde dies durch Phenol-Chloroform-Extraktion erreicht, während zu ligierende DNA-Fragmente zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aufgereinigt wurden.

2.2.1. Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmenten mit einer Länge bis 20 kb wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden 0.8-2%ige Gele mit 1x TAE als Gel- und Laufpuffer verwendet. Zur aufgekochten Agaroselösung (Gibco #540-5510UB) wurden 0.4 µg/ml Ethidiumbromid gegeben und die Proben vor der Beladung des Gels mit 0.2 Volumen Auftragspuffer (50% Glycerin, 1x TAE, 0.2% Orange G) vermischt. Folgende Längenstandards wurden zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente eingesetzt:

- **1 kb-DNA-Leiter** (Gibco-BRL #15615-024): 12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75 bp
- **λ-Hind III** (Boehringer #1218590): 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.6, 0.1 kb
- **φX174-Hae III** (Stratagene #201100): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 bp

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und einer konstanten Spannung von 5 Volt/cm durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Tisch

durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer Polaroidkamera fotografiert.

Pulsfeldgelelektrophorese

Zur Auftrennung von genomischer DNA im Größenbereich von 2-600 kb wurde die Pulsfeldgelelektrophorese eingesetzt. Dazu wurden 1.2 %ige Agarosegele mit 0.5x TBE-Lösung als Gel- und Laufpuffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer Gene-Navigator-Elektrophoresekammer (Pharmacia #19-10-19) mit einer hexagonalen Elektrode (Pharmacia #18-1019-20).

Zur Auftrennung von mit Restriktionsenzymen gespaltener, genomischer DNA, bei der Fragmente von 2-600 kb aufgetrennt werden sollten, wurden die folgenden Bedingungen am Pulsaphor-Pulsgeber (Pharmacia #18-1018-17) eingestellt:

- Auftrennung 2-200 kb: Pulszeit 2-12s ansteigend, Spannung 180V, Laufzeit 15h.
- Auftrennung 9-600 kb: Pulszeit 30s konstant, Spannung 180V, Laufzeit 24h.

Die Temperatur wurde jeweils auf 11°C eingestellt.

Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente diente der λ -Hind III-Marker (siehe oben) und folgender Längenstandard:

- λ -Leiter (New England Biolabs, PFG-Marker #340): 1018, 970, 921, 873, 824, 776, 727, 679, 630, 582, 533, 485, 436, 388, 339, 291, 242, 194, 145, 97, 48 kb

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) gefärbt und anschließend für 10 min in entmineralisiertem Wasser entfärbt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden wiederum auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und fotografiert.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden Fragmente wurden mit einem Skalpell auf einem UV-Tisch aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurde dann der Qiaquick-Kit (Qiagen #28704) verwendet, die Fragmente schließlich in 30-50 µl TE oder H₂O aufgenommen.

2.2.2. Klonierung von DNA-Fragmenten

"TA cloning"

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten aus einer PCR wurde der "TA-cloning-Kit" (Invitrogen #45-0007) verwendet, zu dem der Vektor pCRII gehört. Es handelt sich hierbei um einen linearisierten, 3932 bp großen Plasmid-Vektor, der an seinen 3'-Enden jeweils ein überhängendes Desoxythymidin besitzt.

Einige thermostabile Polymerasen wie die *Taq*-Polymerase führen eine Matrizen-unabhängige Addition eines einzelnen Desoxyadenosin an das 3'-Ende ihrer Syntheseprodukte durch (Clark, 1988). Diese Einzelüberhänge werden nicht entfernt, da die *Taq*-Polymerase keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt. Die durch die *Taq*-Polymerase in einer Polymerase-Kettenreaktion synthetisierten DNA-Fragmente können somit in den pCRII-Vektor inseriert werden.

Zur Ligation wurde 2 µl Vektor-DNA (pCRII; 50 ng), 25-100 ng Insert-DNA (aufgereinigtes DNA-Fragment aus der PCR), die entsprechende Menge 10x Ligations-Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase (1 U) zusammengegeben. Der Ansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert.

2 µl des Ligationsansatzes wurde nach der Inkubation zur Transformation (siehe 2.2.3.) eingesetzt, der Rest bei 4°C gelagert.

pBluescript als "T-Vektor"

Die murinen *Gli3*-Klone, die zu Beginn der Arbeit per RT-PCR erstellt werden konnten (s. 2.4., 3.2.), wurden in einen selbsterstellten "T-Vektor" (überhängendes Desoxythymidin an 3'-Enden) kloniert. Dabei wurde wiederum die Matrizen-unabhängige Desoxyadenosin-Addition an das 3'-Ende der PCR-Produkte genutzt (siehe oben).

Der Vektor wurde folgendermaßen erstellt: 5 µg pBluescript (Stratagene #212205) wurde mit *EcoRV* geschnitten, Phenol-Chloroform aufgereinigt und Äthanol-präzipitiert (s. 2.2.), in 69 µl H₂O resuspendiert und mit 20 µl 5 mM dTTP, 10 µl *Taq*-Polymerase-Puffer und 1 µl *Taq*-Polymerase (5 U; s. 2.4.2.) versetzt. Der Ansatz wurde für 2h bei 75°C inkubiert, dabei wird Matrizen-unabhängig ein einzelnes Desoxythymidin an beide 3'-Enden des Vektors angefügt (nicht entfernt, da *Taq*-Polymerase keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt). Der Vektor anschließend über eine Gelelektrophorese aufgereinigt.

Zur Ligation wurden 20 ng der Vektor-DNA, 25-100 ng der Insert-DNA (aufgereinigtes DNA-Fragment aus der PCR), die entsprechende Menge 10x Ligations-Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) zusammengegeben. Der Ansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert.

2 µl des Ligationsansatzes wurde nach der Inkubation zur Transformation (siehe 2.2.3.) eingesetzt, der Rest bei 4°C gelagert.

2.2.3. Transformation von Plasmiden in *Escherichia coli*

Herstellung kompetenter Zellen

Als bakterielle Wirte wurden in der Regel Bakterien des Stammes *Escherichia coli* RR1ΔM15 (*lacZ*ΔM15) verwendet. Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine modifizierte Version der CaCl₂-Methode (Mandel und Higa, 1970) verwendet. Hierzu wurden 4 ml einer Übernachtskultur in 400 ml LB-Medium verdünnt und unter Schütteln

bei 37°C bis zu einer optischen Dichte ($OD_{595\text{nm}}$) von 0.375 inkubiert. Nach 5 min auf Eis wurden die Bakterien in 50-ml-Aliquots abzentrifugiert (5 min, 3000 upm, 4°C, Heraeus Minifuge RF) und anschließend in je 10 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung (60 mM CaCl_2 , 15% Glycerin, 10 mM PIPES, pH 7.0) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien wieder in je 10 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Bakterien nochmals abzentrifugiert, in je 2 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert und in 100- μl -Aliquots bei -80°C gelagert.

Transformation (Standard)

Die tiefgefrorenen, kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und für 30 min mit der Plasmid-DNA inkubiert. 100 μl der wie beschrieben hergestellten kompetenten Bakterien und 20-100 ng Plasmid-DNA bzw. 2-5 μl aus einem Ligationsansatz wurden für eine Transformation eingesetzt. Nach einem fünfminütigen Hitzeschock bei 37°C wurden die Bakterien mit 450 μl LB-Medium verdünnt und für 60 min bei 37°C inkubiert. 50-150 μl der Bakteriensuspension wurden auf einem ampicillinhaltigen Nährboden (1.5 % (w/v) Bacto-Agar in LB Medium, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-Gal (Applichem #A1007), 0.2 mM IPTG (Applichem #A1008) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die *lacZ*-Region der verwendeten Plasmid-Vektoren codieren für das N-terminale α -Fragment des durch IPTG induzierbaren Enzyms β -Galactosidase. In Bakterien, die das C-terminale Fragment synthetisieren (*E. coli* RR1 Δ M15, s.o.; InV α F', s.u.), kann durch Komplementation mit dem α -Fragment ein enzymatisch aktives Protein konstituiert werden. Solche Bakterien sind in der Lage, das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid (X-Gal) in Galaktose und blau gefärbtes 5-Bromo-3-Chloro-Indigo zu spalten (Langley et al., 1975). Plasmide, die ein Insert innerhalb des *lacZ*-Gens integriert haben, synthetisieren ein Peptid, das keine α -Komplementation erlaubt – die entsprechenden Kolonien bleiben daher weiß ("Blau-Weiß-Screening"). Auf Agarplatten, die Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG, als Induktor) und X-Gal enthalten, können daher Bakterienkolonien mit dem rekombinanten Plasmid durch eine Weißfärbung erkannt werden. Die Selektion auf plasmidtragende Bakterien wird durch die Ampicillin-Resistenz des Vektors ermöglicht.

Transformation "TA cloning"

Kompetente, tiefgefrorene Zellen (*E. coli* InV α F': EndA1, *recA1*, *hsdR17*(r-k,m⁺k), *supE44*, I-, *thi-1*, *gyrA*, *relA1*, f80, *lacZ* Δ M15; im TA cloning Kit enthalten) wurden auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurde 2 μl 0.5 M β -Mercaptoäthanol (im Kit enthalten) und 2 μl des Ligationsansatz (aus pCRII-Ligation) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Als Hitzeschock wurde das Reaktionsgefäß 30 sec bei 42°C inkubiert und dann sofort für 2 min auf Eis gestellt. Dem Ansatz wurden anschließend

450 µl SOC-Medium zugegeben und das Ganze wurde für 1 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert, um die Expression der Antibiotika-Resistenz zu ermöglichen. 50-150 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf einem ampicillinhaltigen Nährboden (mit X-Gal und IPTG, s.o.) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4. Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-Mini-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach alkalischer Lyse der Bakterien-Zellen (Birnboim & Doly, 1979).

5 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Klons angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. 1.5 ml der Übernachtskultur wurden für 1 min bei 12000 upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13), der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in 100 µl Lsg. I (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)) resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurden 200 µl Lsg. II (0.2 N NaOH, SDS (1% w/v)) zugegeben, der Ansatz wurde gut durchmischt und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl 3 M Kalium-Acetat werden chromosomale DNA, Protein-SDS-Komplexe und hochmolekulare RNA aggregiert. Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert und der Niederschlag dann 5 min bei 12000 upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die darin enthaltene Plasmid-DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, Äthanol-präzipitiert und nach der Trocknung in 20 µl TE-Puffer mit 1 µl RNase A (1 mg/l) aufgenommen. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und konnte danach direkt zur Spaltung durch Restriktionsenzyme eingesetzt werden.

Plasmid-Midi-Präparation

Größere und reinere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit dem Plasmidkit der Firma Qiagen aufgereinigt (bis 100 µg = Midi, #12145), bei dem die Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule gereinigt wird. Zur Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des Kit vorgegangen. Die Plasmid-DNA wurde im Spektralphotometer (Beckman DU-68) quantifiziert ($1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml}$).

2.3. ISOLIERUNG VON DNA UND RNA

2.3.1. Präparation von DNA aus Organen

Frisch präpariertes oder tiefgefrorenes Gewebe wurde mit 5 ml PBS versetzt und für 30 Sekunden mit dem Polytron auf Stufe 1 homogenisiert. 1 ml Proteinase K (10 mg/ml; Boehringer Mannheim #124568) und 13 ml TEN9-Lösung (50 mM Tris-HCl, 100 mM

EDTA, 200 mM NaCl, pH 9.0) wurden zugegeben und das Gefäß sofort einige Male leicht geschüttelt. 1 ml SDS (20% w/v) wurde hinzugefügt und die Ansätze dann über Nacht bei 50° unter Schütteln inkubiert.

20 ml Phenol/Chloroform wurden zugegeben und der Ansatz für 1 h bei vertikaler Rotation (30 upm) inkubiert. Anschließend wurde abzentrifugiert (5 min, 2000 upm, Heraeus Minifuge RF), der Überstand in ein Corex-Röhrchen überführt und 15 min zentrifugiert (Beckman J2-21). Der Überstand wurde abgenommen und die DNA mit 0.8 Volumen Isopropanol gefällt. Das Zentrifugat wurde mit 5 ml 70% Äthanol gewaschen und in 2 ml TE resuspendiert. Für Southern-Blot-Analysen wurden je 50 µl der Suspension (ca. 0.1 µg/µl) eingesetzt.

2.3.2. Präparation von DNA aus Schwanzgewebe

Hierzu wurden Mäusen ca. 1 cm Schwanzgewebe entnommen, in 750 µl Lysepuffer gegeben, mit 35 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl gesättigter NaCl-Lösung (Fällung von Proteinen) wurde 5 min geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (10 min, 15000 upm, Heraeus Biofuge 13). Vom Überstand wurden 750 µl abgenommen, die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt und wie oben abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit 500 µl 70% Äthanol gewaschen und in 500 µl TE resuspendiert. Für Southern-Blot-Analysen wurden je 50 µl der Suspension eingesetzt.

2.3.3. Parallele Aufreinigung von DNA und RNA

Zur parallelen Aufreinigung von DNA und RNA aus Schwanzgewebe wurden Qiagen-Tip-20-Säulen (Qiagen #10023) und das zugehörige RNA-Pufferset (Qiagen #19074) verwendet. Dabei wurde die entsprechende Vorschrift des Herstellers befolgt.

2.3.4. Präparation von RNA aus Geweben

Frisch präpariertes oder tiefgefrorenes Gewebe wurde mit 8 ml Lösung D (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 100 mM β-Mercaptoäthanol, 0.5% Lauroylsarcosin, 0.1% Antischaum A, pH 5.6) versetzt und für 30 Sekunden mit dem Polytron auf Stufe 6 homogenisiert. Dann wurden 0.8 ml 2M NaAc pH 4.0, 8 ml wassergesättigtes Phenol und 1.6 ml Chloroform zugegeben, 10 Sekunden auf dem Rüttler durchmischt und 15 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde in Corex-Röhrchen überführt und 15 min zentrifugiert (Beckman J2-21). Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, die RNA 1 h bei -20°C gefällt. Die RNA wurde abzentrifugiert (10 min, 5200 upm, 4°C, Heraeus Minifuge RF) und das Zentrifugat in 2 ml DEPC-H₂O

(0.1% DEPC; Sigma #5758) aufgenommen. Die RNA wurde nochmals mit 2 ml wassergesättigtem Phenol/Chloroform-extrahiert und abzentrifugiert (10 min, 3000 upm, 4°C, Heraeus Minifuge RF). Die RNA aus dem Überstand wurde mit 0.5 Volumen 7.5 M NH₄Ac (DEPC-behandelt) und 2.5 Volumen Äthanol gefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA abzentrifugiert (10 min, 5200 upm, 4°C, Heraeus Minifuge RF), das RNA-Zentrifugat nach kurzem Trocknen in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die isolierte RNA wurde im Spektralphotometer (Beckman DU-68) quantifiziert (1 OD₂₆₀=35 µg/ml).

2.3.5. Präparation von RNA aus Zellen in Kultur

Durch Trypsin-EDTA-Behandlung (siehe 2.8.2.) werden die Zellen vom Schalenboden abgelöst und in einem 15ml-Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (5 min, 1000 upm, Heraeus Megafuge). Die Zellen wurden in PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 500 µl Lösung D lysiert. Zur Abtrennung der RNA wurden 50 µl 2 M Natriumacetat (pH 4.0), 500 µl wassergesättigtes Phenol und 100 µl Chloroform zugegeben, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 upm, 4°C, Heraeus Biofuge 13) wurde der Überstand mit 400 µl Chloroform vermischt und erneut wie oben zentrifugiert. Aus diesem Überstand wurde die RNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt (90 min, -20°C). Nach der Zentrifugation (15 min, 13000 upm, 4°C) wurde das Zentrifugat mit 70%igem und 100%igem Äthanol gewaschen und kurz getrocknet. Anschließend konnte die RNA in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert werden.

2.4. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

2.4.1. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide ("Primer")

Gli3-spezifische Primer :

Bezeichnung	Sequenz
3'B1	ATAGCCATGTTGGTGGTGCCCATG
3'B2	CATGCCATTCACTGTGTTGCC
3'B3	TCCGATAGCCATGTTGGTGG
3'F1	CCTCCCAGCATCACAGAGAATG
3'F3	CCATGAACAGCCCTTTAAGACCC
3'F4	GGGTGAACAGCATCAAATGGAG
3'F5	GCTAACCCAGGTAACAAGCACAGTTG
3'RACE-F1	ACTCCGCGGGCATCCCTC
5'B1	GCGTTTCTTCTCTCTCGGTGATAG
5'B2	AAACACAGTCCCACGGTAAGGG
5'B3	AATTGGTACAGGAGGATGGAAGG
5'B4	GGTCGAAGCTATGATCTGACAGTGG

5'F3	GCAGGGATTCTTTGAGAAACAAG
5'F4	CCTTACCGTGGGACTGTGTTTG
5'F5	AAGCCGCAGGGATTCTTTG
5'F7	CGTATCCAGACTTGCCCTTCATTAG
5'F8	AGTCAGCCCTGCGGAATACTATCA
5'gap-B1	TTGCCGATAAGTGCCCATAGG
B1	GGCAACATTCTCTGTGATGCTGG
B2	GGCAGGAGGTCTTCATCATTCAAG
B3	ACTGTACCACATCATCTGGCAGG
B4	CATCTGGCAGGAGGTCTTCATC
B5	GCTCATGGGCTACTTTGCTGTC
B6	GCCCTGCTAAGTCCAAGTCCTC
F1	TCCAATGAGGATGAAAGTCCTGG
F2	CGAGAACAGATGTCAGCGAGAAGG
F3	CCATTGGGAAATGTCCCACG
h3'-B1	CTGAAATGGAAGACAGTTTCTCCC
h5'gap-F1	GCCGAAAACGTACACTGTCCATATC
hGLI3-F1	CAAAATCCCAGGCTGCACTAAG
NS350-B1	GCCTTCTCGCTGACATCTGTTCTC
NS350-B2	CTGATTTTGTTGAGACCCTGCAC
NS350-F1	AAGCCGCAGGGATTCTTTG
NS350-F2	CCACTTCCAATGAGGATGAAAGTC
ZF-B1	TGATCTTGGGTGTGCGAACTCTCTG
ZF-B2	CCCGATCTGAAGCATTAGAGAAAG
ZF-B4	AAATGCTCCCTGAGTTGGCC
ZF-B5	GACCACCAGGGCTTGGCTGAGATGTCATTG
ZF-B6	CAAGCTGATCTTGGGTGTGCGAAC
ZF-B7	TGCACAAGCTGATCTTGGGTGTGCGAACTCT
ZF-B8	CCTATGAGAGGAGATACCGCAG
ZF-F2	GGTTGCACAAAAGCCTACTCAAGAC
ZF-F3	CACTGGGAAGGCTGCACCAGAGATTCTGA
ZF-F4	GCCTGATGAAGACCTCCCC

ETn spezifische Primer:

Bezeichnung	Sequenz
cDNA1 For	AAGTGTTGCTGAGGATGCGG
Etn U3-Back	TGGCAGAACGAATGAGCAGG
Etn U3-For	CCTCCCCCTTCCTTCATAACTG
cDNA1 unique Back	CCGCATCCTCAGCAACACTTTAC
cDNA2/3 cons. Back	GGCAGAACGAATGAGCAGGAAG
ETn For	CCTTCTCAGTCGAACCGTTCAC
ETn Back	CGTTCTCTTAGCATCTCTCTGCC
ETn Back2	TGCTCCGATGTCCGATACGAAG

2.4.2. PCR-Amplifikation

PCR-Reaktionen wurden in Perkin-Elmer-Maschinen (GeneAmp 2400) durchgeführt. Als Enzym wurde die *Taq*-Polymerase und das zugehörige Puffersystem von Boehringer Mannheim (#1146165) verwendet. Der 50- μ l-Standardansatz enthielt 0.5 μ l *Taq*-Polymerase (2.5 U), 5 μ l 10x-Reaktionspuffer (100 mM TRIS-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 25 pmol dNTP, und je 10-50 pmol der spezifischen Oligonukleotide (Primer). Standardmäßig wurden die folgenden PCR-Reaktionsbedingungen angewendet:

1x	1 min 94°C
35x	10 s 94°C
	30 s 56-58°C
	30 s 72°C
1x	7 min 72°C

2.4.3. Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden entweder spezifische oder oligo(dT)-Primer verwendet. 2 μ g totaler RNA wurden zusammen mit dem Primer (2.5 μ M) denaturiert (10 min 65°C) und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 μ l DTT (100 mM), 2 μ l 10x-Stratascript-Puffer (0.5 M TRIS/HCl pH 8.3, 750 mM KCl, 300 mM MgCl₂), 0.5 μ l RNase-Inhibitor (25-40 U, Stratagene (#300151), 2 μ l dNTP (je 10 mM) und 1 μ l Stratascript (20 U; Stratagene #200420) wurde der Reaktionsansatz mit DEPC-behandeltem Wasser auf 20 μ l aufgefüllt und für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Für die anschließenden PCR-Reaktionen (siehe oben) wurden in der Regel 2 μ l des 20 μ l Standardansatzes als Vorlage verwendet.

2.5. SEQUENZIERUNG

2.5.1. Sequenzen der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC
3'31	CATTCTCTGTGATGCTGG
3'32	TCCTCGGGGCATGAACTG
3'33	GTCTCTCCTCACACTGTTGG
3'34	GTCACCCAGAGTCCCTC
3'35	AGGCTGAGCAGACTGGGC
3'50	TTACCAAGAAGCAGCGTG
3'51	CAGCCATTACAGTCCAG
3'52	AGCAACTATTCCAACAGTGG

3'53	CAGCCCTTGCTTTGCAAG
3'54	AACAGGAGAGACAGCAATAC
3'55	TGCAGCTCCGACAGGTGG
3'end-51	CCAAGTATTATTCAGAACC
331	GCTGTGGGAAAGGTTCTG
332	GGGAGAGTAACCTCAGAGTTTTTC
333	GGAATAATTCTGCACGGTAGAG
351	GTTGCAGAGTGGCATCTC
352	GTCAGTTCTGGAACCTTCTGATC
353	CGGGAGAATAGCAGTACCTAC
354	CAAGGGTCCAAGCTAAAAG
5'31	CTGATTTTGTGAGACCCTG
5'32	TAGAGCTGTGGCCTGGG
5'33	ATGAGGAGGGTGGTAGTG
5'51	GCCCTTAGTCGTTGAAAAG
5'52	CGCCCGCACACTCGTCCG
5'53	ATCAGTGAGGAGCCCTCGAC
5'54	ACCGAGAGAGAAGAAACG
5'gap-31	CATGGCATGAAGGTCATC
5'gap-32	GCAATGAGCGGATGTAGTC
5'gap-33	GATCATAATGGTAACGGC
5'gap-34	ATGAGGAGGGTGGTAGTG
5'gap-51	GTAGCCCGACGTATCCAG
5'gap-52	CCATCCCTCTCCATGATC
5'gapII-minus	GAGGTCTTCATCAGGCTTG
5'gapII-plus	TTCCTATGGGCACTTATCG
ZF-31	CAAATGCTCCCTGAGTTG
ZF-51	TGAAGGTTGCACAAAAGC

2.5.2. Radioaktive Sequenzierung

Um die DNA-Sequenz zu erhalten wurde nach der Dideoxynukleotid-Methode von Sanger vorgegangen (Sanger et al., 1974; 1977) und der Sequenase-Kit (USB #70770) verwendet.

Sequenzierungsreaktion

Zur Denaturierung der Plasmid-DNA und Anlagerung des Primers wurde folgendes zusammengegeben:

- 6 µl Plasmid-DNA aus Maxiprep (ca. 1-2 µg)
- 1 µl Primer (ca. 10-25 ng)
- 1 µl 1 M NaOH
- 10 min 65°C
- kurz anzentrifugieren

2 µl TES zugeben (560 mM TES (N-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethansulfonsäure, Sigma #T-4152), 240 mM HCl, 100 mM MgCl₂)

15 min Raumtemperatur

Zu dem Anlagerungsansatz wurde nun für die Markierungsreaktion folgendes zugegeben:

1 µl 0.1 M DTT

2 µl verdünnter Markierungsmix (dGTP Label Mix 1:5 in H₂O)

0.5 µl [α-³⁵S]dATP 10 µCi/µl, 10 µM (Amersham #SJ1304)

2 µl verdünnte Sequenase (Sequenase 2.0 1:8 in TE)

5 min Raumtemperatur

Pro Markierungsreaktion wurde in der Zwischenzeit auf einer Mikrotiterplatte je 2.5 µl ddATP, ddCTP, ddGTP bzw. ddTTP (A-, C-, G- oder T-Mix) auf 37°C erwärmt. Dazu wurde nach Ende der Markierungsreaktion jeweils 3.5 µl des obigen Ansatzes gegeben. Die Ansätze wurden für 5 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 4 µl Stop-Lösung (0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylencyanol FF, 20 mM EDTA pH 7.5, 95% deionisiertes Formamid) beendet.

Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Sequenzierungen wurden 6%ige Polyacrylamidgele verwendet. Ansatz für 50 ml: 10 ml 40% Acrylamid (19:1) Mix 4K (Applichem #A1640), 15 ml H₂O, 25 g Harnstoff, 5 ml 10 x TBE. 500 µl 10%ige Ammoniumpersulfatlösung und 20 µl TEMED wurden zum Starten der Polymerisation kurz vor dem Gießen des Gels der Lösung zugesetzt und durch Schwenken vermischt. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen des Gels mit Detergenz und Äthanol gesäubert und entfettet. Eine der Platten wurde auf der Innenseite mit Dichlordimethylsilan behandelt, damit diese nach der Elektrophorese leicht wieder abgetrennt werden konnte. Die Acrylamidlösung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, zwischen denen sich 0.4 mm dicke Abstandhalter befanden. Nach einer Polymerisationszeit von einer Stunde wurde ein Taschenformer eingesetzt und die Taschen mit 1 x TBE-Puffer gespült. Es folgte ein Gelvorlauf von 30 min bei 55 W. Danach wurden die Taschen wiederum gespült. Die Sequenzierproben wurden 2 min bei 80°C denaturiert und dann je 2.5 µl aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte über Laufzeiten von 1.5-5 h bei 55 W, als Elektrodenpuffer diente 1x TBE.

Nach Beendigung des Laufes wurde das an die Glasplatte gebundene Gel fixiert (10% Essigsäure, 10% Äthanol), auf ein Whatman 3MM-Filterpapier überführt und für 1 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Zur Autoradiographie wurde das Gel über Nacht auf einem Kodak BIOMAX-Röntgenfilm oder einer Fuji Bildplatte BAS-IIIIs bei Raumtemperatur exponiert (digitale Auswertung mit Fujix BAS 1000 Biobild-Analysator, Fuji Photo Film Co.).

2.5.3. Fluoreszenzsequenzierung

Ein Teil der klonierten PCR-Produkte wurde mit einem DNA-Sequencer der Firma Applied Biosystems (ABI 310 PRISM Genetic Analyzer) sequenziert. Elektrophorese und Detektion erfolgen hierbei in einer Kapillare, die vor jeder Sequenzierung 2 µl einer 7%igen Polyacrylamidlösung einzieht. Die Markierung der DNA am 3'-Ende erfolgt bei dieser Methode durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden, den *Dye*-Terminatoren, die für jede der vier Basen eine andere Farbe besitzen. Mittels eines Laserstrahls werden die in der Kapillare aufgetrennten DNA-Fragmente auf ihre Farbe hin abgetastet, das Lichtsignal wird von einem Photomultiplier detektiert und in ein elektrisches, digitales Signal umwandelt (Smith et al., 1986). Die Auswertung dieser Daten erfolgt durch einen angeschlossenen Computer.

Die automatische Sequenzierung wurde mit dem "ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems #402080) durchgeführt. Auch hier wurde nach der Methode von Sanger vorgegangen, wobei die DNA-Synthese aber mittels einer PCR (s. 2.4.2.) durchgeführt wurde. Daher ist auch keine alkalische Denaturierung nötig, da diese zu Beginn jedes Reaktionszyklus durch Hitze erfolgt. Als Sequenzierungsprimer wurden die unter 2.4.1. und 2.5.1. aufgeführten Oligonukleotide verwendet.

Im Terminator-Mix ist neben den Didesoxynukleotiden bereits auch die Taq-Polymerase enthalten. Folgendes wurde für eine "Cycle-Sequenzierung" zusammengegeben:

- 0.4-1 µg DNA
- 10 pmol Oligonukleotid-Primer (s.o.)
- 8 µl Terminator-Mix
- H₂O ad 20 µl

25 Zyklen mit folgenden Parametern wurden durchgeführt:

- 10 s 96°C
- 5 s 50°C
- 4 min 60°C

Anschließend wurde der Ansatz mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und die DNA Äthanol-präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 30 µl TSR-Puffer (Applied Biosystems #401674) aufgenommen, 2 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Proben werden mittels eines speziellen Halters in das Gerät eingebracht, die Sequenzierung erfolgt dann vollautomatisch, wobei die Sequenzdaten von einem angeschlossenen Computer aufgezeichnet werden

2.6. HYBRIDISIERUNG

2.6.1. Herstellung radioaktiv markierter Sonden

DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung mit dem "Prime-It II Random Primer Labeling Kit" (Stratagene #300385) wurden 10-50 ng eines DNA-Fragments sowie 50 μCi α - ^{32}P -dCTP (10 mCi/ml) (Amersham #PB10205) eingesetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde zur Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide 20 μg tRNA als Träger zugegeben, mit 0.5 Volumen NH_4Ac und 3 Volumen Äthanol gefällt (10 min RT, 10 min 15000 upm, Heraeus Biofuge 15) und nach Waschen mit 70%igem Äthanol in 100 μl TE aufgenommen. Die Aktivität der Sonde wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung im Szintillationszähler (Beckman LS6000SE) bestimmt.

RNA-Sonden

Für die RNase Protektionsanalyse (s. 2.6.5.) wurden hier durch *in vitro*-Transkription entsprechender DNA-Fragmente spezifische Sonden erstellt. Zur radioaktiven Markierung dieser Sonden wurde je nach Plasmid 20 U T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase mit dem entsprechenden Puffersystem (Boehringer Mannheim, T3 #1031163, T7 #881767, SP6 #810274), je 10 $\mu\text{mol/l}$ d(G/A/C)TP, 100 μCi α - ^{32}P -UTP (10 mCi/ml) (Amersham #PB20383) und 1 μg linearisierte Plasmid-DNA eingesetzt. Zur Hemmung von RNasen wurde der Markierungsreaktion 20 U RNase-Inhibitor (Stratagene #300151) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 μl RNase-freier DNase (Boehringer Mannheim #776785) abgedaut (5 min, 37°C). Anschließend wurden die nicht eingebauten Nukleotide durch Phenol-Chloroform-Extraktion abgetrennt, die RNA Äthanol-präzipitiert, mit 70%igem Äthanol gewaschen und in 100 μl RNase-freiem TE aufgenommen. Zur Messung der Aktivität der Sonde wurde die Cerenkov-Strahlung gemessen.

2.6.2. Southern Blot-Analyse

Der Kapillartransfer von DNA wurde nach der Methode von Southern (1975) durchgeführt.

Nach Spaltung durch Restriktionsenzyme über Nacht wurden die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.1.). Nach der Elektrophorese wurde das Gel zum besseren Transfer großer Moleküle 15 min mit 0.25 N HCl behandelt, anschließend mit H_2O gewaschen. Danach wurde das Gel für 15 min mit 500 ml Denaturierungslösung behandelt. Zum Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Genescreen, DuPont #NEF-972) werden 3 Whatmanfilter, das Agarosegel, die Nylonmembran, wiederum 3

Whatmanfilter und Zellstoff luftblasenfrei aufeinandergeschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Die Whatmanfilter und die Nylonmembran wurden zuvor in Denaturierungslösung getränkt. Nach Transfer ("Blot") über Nacht wurde die Orientierung der Nylonmembran und die Lage der Geltaschen markiert. Zur Immobilisierung der DNA wurde die Membranen 30 min bei 80°C in einem Ofen gebacken und anschließend mit UV-Licht bestrahlt ("Auto-Crosslink" Modus, Stratalink, Stratagene). Die Membranen wurden dann zur Hybridisierung eingesetzt (siehe 2.6.4.).

2.6.3. Northern Blot-Analyse

Für dieses Verfahren wurden jeweils 20 µg RNA in 13 µl in DEPC-H₂O gelöst, 20 µl 100 % Formamid, 7 µl 37 % Formaldehyd, 1 µl 50x MOPS, 4 µl 1 % Bromphenolblau und 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) hinzugegeben. Diese Proben wurden vor dem Auftragen 5 min bei 65°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgt unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von Formaldehyd zu Gel- und Laufpuffer (20 mM MOPS, 5 mM NaAc, 0.05 M EDTA, pH 7.0, 6.2 % Formaldehyd). Während der Elektrophorese wurde der Laufpuffer zwischen den Elektrodenräumen umgepumpt. Nach der Elektrophorese (2-3 Stunden bei 150 V) wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und 20 min in 20x SSC inkubiert. Der Aufbau für das Blotten entsprach dem beim Southern-Verfahren, als Transferpuffer wurde hier 20x SSC verwendet. Am nächsten Tag wurde die Orientierung der Nylonmembran und die Lage der Geltaschen markiert, die Nylonmembran dann 20 min in 2x SSC gewaschen. Die Fixierung der RNA erfolgte durch zweistündiges Backen bei 80°C und anschließende UV-Bestrahlung (siehe oben). Die Membranen wurden dann zur Hybridisierung eingesetzt (siehe 2.6.4.).

2.6.4. Hybridisierung nach Church

Die Hybridisierung wurde nach einem modifizierten Protokoll der Methode von Church & Gilbert (1984) durchgeführt. Die trockenen Membranen wurden so in eine Plastikfolie eingeschweißt, daß eine Seite offen blieb. Durch die Öffnung wurden 25 ml Church-Puffer eingefüllt, so daß die Membranen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde (siehe oben; 2×10^6 cpm/ml Churchlösung) wurde mit NaOH (Endkonzentration 0.5 M) für 20 min denaturiert und zu den Membranen gegeben. Die Kunststoffolie wurde luftblasenfrei verschlossen und über Nacht bei 65°C unter Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Hybridisierungslösung verworfen, die Membranen einmal mit Waschpuffer abgespült, dann für 5 min in selbigem Puffer bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend erneut der Puffer gewechselt und für 30-60 min bei 65°C inkubiert.

Danach wurden die Filter wiederum in Plastikfolie eingeschweißt und auf einem Kodak-X-OMAT Röntgenfilm mit Signalverstärkerfolie bei -80°C oder einer Fuji Bildplatte BAS-IIIIs bei Raumtemperatur exponiert (digitale Auswertung mit Fujix BAS 1000 Biobild-Analysator, Fuji Photo Film Co.).

2.6.5. RNase-Protektionsanalyse

Je Ansatz wurden 20 μg totaler RNA mit 0.1 Volumen 3M NaAc pH 5.2 und 3 Volumen Äthanol für 30 min bei -20°C gefällt, 10 min bei 13000 upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13), mit 70%igem Äthanol gewaschen und in 30 μl Hybridisierungspuffer (40 mM PIPES, pH 6.4, 1 mM EDTA, 0.4 M NaCl, 80% Formamid) resuspendiert. Von einer RNA-Sonde (s. 2.6.1.) wurde 5×10^5 cpm zugegeben, 10 min bei 85°C denaturiert, kurz anzentrifugiert und bei 45°C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde 300 μl RNase-Spaltungspuffer (300 mM NaCl, 10 mM TRIS/HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 2 $\mu\text{g/ml}$ RNase T1 (Boehringer Mannheim #109207), 40 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (Boehringer Mannheim, #109169) zugegeben und eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Inaktivierung der RNasen geschah durch Zugabe von 10 μl SDS (20% w/v), 10 μl Proteinase K (10 mg/ml) und Inkubation bei 37°C für 30 min. Die geschützten RNA-Fragmente wurden mit Phenol-Chloroform extrahiert und unter Verwendung von 20 μg tRNA Äthanol-präzipitiert, schließlich mit 70%igem Äthanol gewaschen und in 15 μl Auftragspuffer (s.u.) resuspendiert. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und je 3 μl auf einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel (siehe 2.5.2.) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 3 h bei 55 W, als Elektrodenpuffer diente 1x TBE. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel fixiert, auf ein Whatman 3MM-Filterpapier überführt, getrocknet und exponiert wie unter 2.5.2. beschrieben.

Auftragspuffer: 200 μl 0,5 M EDTA, 10 mg Bromphenolblau, 10 mg Xylencyanol, 8 ml Formamid, ad 10 ml H_2O

2.7. ANALYSE VON cDNA-BIBLIOTHEKEN

Clontech Brain #ML1036a

Um weitere *Gli3*-spezifische cDNA-Fragmente zu isolieren, wurde diese λ -Phagenbibliothek untersucht. Die cDNA, die sie enthält, stellt die RNA aus adultem Maus-Gehirn dar.

Erstellt wurde die Bibliothek durch reverse Transkription mit oligo(dT)-Primer und anschließende Integration der cDNA in $\lambda\text{gt}10$ -Phagen durch Adaptoren mit Schnittstellen für das Restriktionsenzym *EcoRI*. Nach Herstellerangaben waren 1.4×10^6 unabhängige Phagenklone in der Bibliothek enthalten. Sie war auf 16 Agaroseplatten (22x22 cm) ausgesät worden, wovon 8 der ursprünglichen Platten waren bei -80°C konserviert worden

waren. Da von diesen Platten jeweils Nylonfilterreplikas existierten, wurde diese Membranen zur Untersuchung verwendet.

ICRF No. 510 MBR cDNA

Diese Bibliothek, die von der Reference Library Database (Lehrach et al., 1990) zur Verfügung gestellt wurde, repräsentiert ebenfalls die Gehirn-RNA einer adulten Maus. Hier wurde nach reverser Transkription die cDNA über *NotI/SaI* in das Plasmid pSPORT kloniert. Aufgrund maschineller Ausführung konnten 18000 cDNA-Klone auf eine Nylonmembran aufgetragen werden. Zwei Membranen (Original plus Replika) wurden mit den vorhandenen cDNA-Klonen (siehe oben) als Sonde hybridisiert. Von doppelt positiven Signalen wurden die jeweiligen Koordinaten ermittelt und die Klone bei der Reference Library Database in Berlin bestellt. Nach Lieferung als Stechagarkultur wurden die Klone in LB-Amp-Kulturen hochgezogen, Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

2.8. ZELLKULTUR

Zellkulturgefäße wurden von der Firma Nunc bezogen, die Arbeiten in einer Heraeus Sterilwerkbank durchgeführt und die Zellen in einem begasten Brutschrank der Firma Heraeus bei 7.5% CO₂ und 37°C inkubiert.

2.8.1. Zelllinien

Zur Gewinnung von RNA wurde die Mausfibroblasten-Zelllinie NIH Swiss 3T3 (ATCC CCI 92) eingesetzt.

Maus Embryonale Fibroblasten (MEF)

Zur Gewinnung von MEF wurden Mäuse verpaart und Föten am 12.-14. Tag der Embryogenese isoliert (siehe 2.9.). Die Föten wurden in einer Zellkulturschale mit einem sterilisierten Erlenmeyerkolben in 2ml PBS verrieben. Weitere 8 ml PBS wurden zugegeben, die Zellsuspension in ein 15ml-Falcon-Röhrchen überführt und der Überstand nach Absinken der gröberen Bestandteile abgenommen und abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in 5 ml MEF-Medium (siehe unten) resuspendiert und in einer kleinen Zellkulturflasche ausgesät. Aus dem embryonalen Gewebe wuchsen nach 1 bis 2 Tagen fibroblastenartige Zellen aus. Diese MEF-Zellen wurden nach Erreichen der ersten Konfluenz in eine große Zellkulturflasche passagiert (siehe unten). Nachdem die Zellen bei einer weiteren Passage 1:4 verdünnt worden waren, wurde aus ihnen RNA isoliert.

MEF-Medium: DMEM (Gibco #41965-039)
10 % foetales Kälberserum (Boehringer Mannheim #210471)
1% Penizillin/Streptomycin (Gibco #14140-114)
1% Glutamat (Gibco #15140-114)

2.8.2. Passagieren von Zellen

Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und je nach Größe der Zellkulturschale 1-5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco #45300-027) zugegeben. Nach zweiminütiger Inkubation im Brutschrank wurden die abgelösten Zellen in Medium resuspendiert und ein Teil der Zellsuspension in neue Kulturgefäße ausgesät.

2.9. TIEREXPERIMENTELLE VERFAHREN

Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte im Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover.

Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde eine Schwanzbiopsie vorgenommen, aus dem entnommenen Gewebe DNA und RNA präpariert (s. 2.3.3.) und mittels PCR analysiert. Embryonen wurden ebenfalls durch PCR genotypisiert, nachdem RNA aus ihnen präpariert worden war (s. 2.3.4.). *Pdn/Pdn*-Embryonen können jedoch bereits durch ihren Phänotyp (s. 1.2.) eindeutig bestimmt werden.

Isolierung definierter Embryonalstadien

Mäuse wurden als Paare zusammen in einen Käfig gesetzt und die Weibchen am nächsten Morgen auf Vaginalpfropfen hin untersucht. 12 Uhr am Tag des Vaginalpfropfs wurde als Tag 0.5 der Embryonalentwicklung definiert. Nach Erreichen des erwünschten Alters der Embryonen wurde das Muttertier getötet und die Embryonen isoliert. Diese wurden zur Erstellung von MEF-Kulturen bzw. zur Präparation von RNA eingesetzt.

3. Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit waren nur zwei Fragmente der murinen *Gli3*-cDNA bekannt (Klone 5' und 3', s. Abb. 3.2.2). Daher wurde zuerst die vollständige Charakterisierung der cDNA angestrebt, da diese auch eine Hauptvoraussetzung für die Analyse der *Gli3*-Mutation in *Pdn* war.

3.1. UNTERSUCHUNG VON cDNA-BIBLIOTHEKEN

Zur Bestimmung der *Gli3*-Sequenz wurden cDNA-Bibliotheken untersucht, um aus diesen weitere Klone zu isolieren. Es wurden dazu zwei Bibliotheken gewählt, die die RNA aus Maus-Gehirn repräsentieren, da *Gli3* im Gehirn stark exprimiert wird (Schimmang et al., 1992).

Als Sonden für die Untersuchung der beiden Bibliotheken (s. 2.7.) wurden die bereits vorhandenen Klone (s. Abb. 3.2.2) eingesetzt. In der Clontech λ -Phagenbank konnte mit diesen jedoch kein positiver Klon identifiziert werden. Während die Untersuchung der ICRF cDNA-Bibliothek mit der 3'-Sonde ebenfalls negativ verlief, konnten unter Verwendung der 5'-Sonde 4 Klone isoliert werden. Diese wurden sequenziert, die Sequenzen zeigten jedoch keine Übereinstimmungen mit der Sequenz des 5'-Klons, mit dem die Bibliothek untersucht worden war, so daß sich die ICRF-Klone als falsch positiv erwiesen.

Da durch diese Analysen keine spezifischen cDNA-Fragmente gefunden werden konnten, wurde die Untersuchung von cDNA-Bibliotheken nicht weiter verfolgt, stattdessen wurde mit einem RT-PCR basierten Ansatz begonnen.

3.2. AMPLIFIKATION VON *Gli3* cDNA-FRAGMENTEN DURCH RT-PCR

Grundlage dieses Ansatzes war die große Homologie der humanen und murinen *Gli3*-cDNA-Sequenz in den bis dahin bekannten Bereichen und die starke Konservierung der Zink-Finger-Region innerhalb der *Gli*-Familie (Hui et al., 1994). Es wurde daher versucht, unter Nutzung jeweils eines murinen *Gli3*-PCR-Primers und eines Primers, der aus der humanen *GLI3*-Sequenz abgeleitet wurde, die fehlende cDNA-Sequenz zwischen den beiden vorhandenen Klonen zu erhalten.

Dazu wurde totale RNA aus MEF-Zellen verwendet, da diese eine gewissermaßen unbegrenzte RNA-Quelle darstellen, und mit oligo(dT) bzw. *Gli3*-spezifischen Primern (s. 2.4.1.) reverse Transkriptionen durchgeführt. Desweiteren wurde RNA aus NIH 3T3-Zellen genutzt, da diese eine sehr starke *Gli3*-Expression aufweisen (U. Rütter, persönliche Mitteilung).

Die Primerkombinationen, die in der sich jeweils anschließenden PCR zur Amplifikation eingesetzt wurden, sind in Abb. 3.2.1 aufgeführt, die erhaltenen Produkte in Abb. 3.2.2 dargestellt.

Primer-Kombination	Produkt
5'F4/5'gap-B1	5'gapI (688 bp)
h5'gap-F1/ZF-B6	5'gapII (630 bp)
ZF-F3/ZF-B5	ZF (683 bp)
hGLI3-F1/B4	3'gap (1449 bp)
3'F5/h3'B1	3'end (485 bp)

Abb. 3.2.1: Eingesetzte Primerkombinationen und erhaltenene PCR-Produkte (siehe auch Abb. 3.2.2).

Die durch die RT-PCR erhaltenen Produkte wurden kloniert und sequenziert. Auf diese Weise konnten sukzessiv 3037 bp zuvor unbekannter Sequenz des murinen *Gli3* ermittelt werden. Zusammen mit den bereits bekannten Sequenzen waren damit 5112 bp der ca. 9 kb mRNA bekannt. Damit wurde der gesamte kodierende Bereich abgedeckt (s. Abb. 3.22).

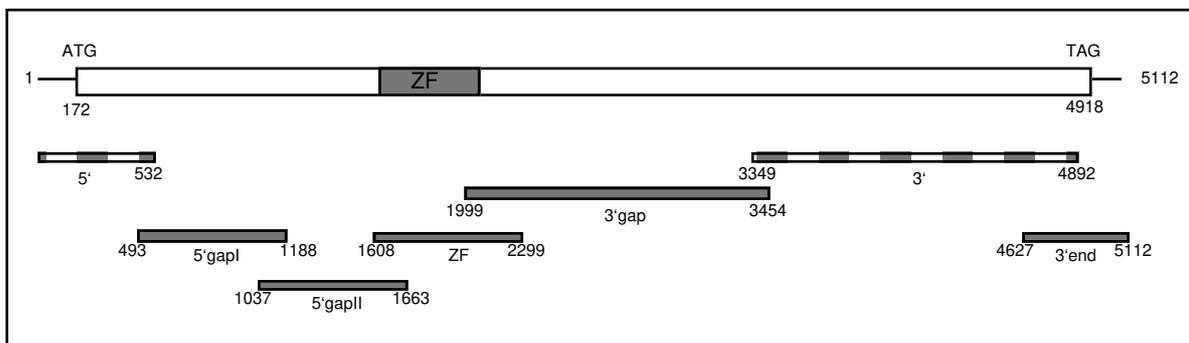


Abb. 3.2.2: RT-PCR Produkte und resultierendes murines *Gli3*-cDNA-Fragment, das den gesamten kodierenden Bereich enthält. Die mit 5' und 3' bezeichneten Klone (gestreifte Darstellung) waren bereits zu Beginn der Arbeit vorhanden und wurden zur Untersuchung zweier cDNA-Bibliotheken verwendet (s. 3.1.).

Die einzelnen Sequenzen wurden zu einer Gesamtsequenz zusammengeführt. Der längste offene Leserahmen dieser Sequenz von 4746 bp (Pos. 172-4918) lässt sich in eine Proteinsequenz von 1582 Aminosäuren translatieren. Die cDNA- und die abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abb. 3.2.3 dargestellt.

Anmerkung: Durch die unter 3.6. beschriebenen Untersuchungen wurde ein Fehler in der bereits veröffentlichten Wildtyp-Sequenz (Thien et al., 1996) ermittelt. In dieser war an Position 4822 ein zusätzliches Adenin eingefügt, so dass sich eine Differenz im längsten offenen Leserahmen ergibt (publ. 4788 bp statt hier 4746 bp, entsprechend publ. 1596 statt hier 1582 abgeleiteter Aminosäuren). Dies hat zudem eine Änderung der Sequenz der abgeleiteten Aminosäuren 1551-1582 zur Folge. In Abb. 3.2.3 ist die korrigierte Version dargestellt, alle nachfolgenden Sequenzvergleiche wurden mit dieser durchgeführt.

3.3. SEQUENZVERGLEICHE MIT MITGLIEDERN DER *Gli*-FAMILIE

Zur Bestätigung der Einordnung der neuen Daten als murine *Gli3*- Sequenz und zur Analyse von Homologien wurden obige Daten mit den Sequenzen verschiedener Mitglieder der *Gli*-Familie verglichen, die in Datenbanken vorhanden sind. Die Ergebnisse dieser Vergleiche sind in Abb. 3.3.1 als Übersicht dargestellt. Als *Gli1*-Vertreter wurde die humane Sequenz verwendet, da die murine erst teilweise bekannt ist.

Homologie zu <i>Gli3</i> in %	hGLI3	XGLi3	mGli2	hGLI1
cDNA-Sequenz	83,9	63,5	50,9	24,4
Aminosäuresequenz	83,5	66,9	35,7	14,0

Abb. 3.3.1: Homologien der murinen *Gli3* cDNA- und der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit verschiedenen Mitgliedern der *Gli*-Familie. (Abkürzungen: hGLI3 = humanes *GLI3*; XGLi3 = *Xenopus-Gli3*; mGli2 = murines *Gli2*; hGLI1 = humanes *GLI1*)

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des murinen *Gli3*, *Gli2* und humanen *GLI1* (s. Abb. 3.3.2) zeigt Homologien von nur 35,7% bzw. 14,0%. Lediglich im Bereich der Zink-Finger ist hier eine höhere Homologie zwischen murinem *Gli3* und *Gli2* erkennbar (92,5%).

mGli3	1	MEAQAHSSATERKKAENSIGKCPTRTDVSEKAVASSTTSNEDESPGQIYHRERRNAITMQPQSVQGLNKISEEPSTSSDERASLIKKEIHGSLPHLAEP
mGli2	1	METSAPAPAL . KKEAKSGLLEDSFFDP . KKACPLAV
mGli3	101	SLPYRCTVFAMDRNGVMEPHYHPPHLLFPFHPVPPIDARHHEGRYHYDPSPIPLHVPVSALESSPTYPDLFFIRISPHRNPTAAESPFSPPHYINPY
mGli2	38	AAVAHAHVQQLLPAPFA . LPIDMRHQEGRVHYD . HVSVSVH . PPTLSG . VISDISLIR . .PH . AG . GESPFSAHHPVYVNMHEHYLR . VHSSPTLSM
mGli3	201	MDYIRSLHCSPLSMISAARGLSPTDAPHAGVSPAERYHQALLTGQRSPYADILPSAATAGAGAIHMEYLHAMDSTRFPSPRLSARPSRKRTLSISPLS
mGli2	138	ISAA . G . SPADVAHEHLKE . . FSLA TN . SD T . MASHPT . . G . L . MQSGG . ASAPHLHD . . NPV . AS VTP . L
hGLI1	1	MFNSMTPPPIS . YGEPCCCLRPL . SQGAPSVGTEGLSGP . FCHQANLMSGPHSYGPAR . TNSCTEGPL . S SAVKLTK . . A
mGli3	301	DHSFDLQTMIRTPNSLVITLNNRSRSSASGSYGHLSASAISPALSFTYTPSAPVSLHMQOILSRQOQLGSAFGHSPPLIHPAPTFPT . ORP . IPGIPTV
mGli2	236	. A . L R AYI A G . L FT . PH . IN . . AY Q . RG T Q . S LA . . Q . MTLTIS
hGLI1	90	. A . L V S AF . I CT . P . G IGTM . . S . G . PAQMNHQKGPSFSGVQPCGPHD . . R . GMI . HPQSRGP . . . C . LKSELDML .
mGli3	400	LNPVQVSSGSPSS Q . SKPTSESASVSTGGPMH . NKRSKIKPDEDLPSGSR . G . QOEQEGTTLVKEEADKDESKOEP . V . IY . TNCHEWEGCTRE
mGli2	332	TM . T . L . . SS . NCLNDAN . . N . QN VN . ITIH V . TEAEGLR . A . PL . LT LAD DL . R . DC A . V AD . . K .
hGLI1	188	GKCREELEGDM PN . TGIQDPLLGLD . RED . LE . EEKREP . SVYETDC . . W . DGCSQ . FDSQEQLVHINSEHIG . RK FV G . S . .
mGli3	491	FDTQD . QLVHINNDHIHGKKEFVCRWLDCRSRQKPFKAQYMLVVMHRRHTGKPKKCTFEGCTKAYSRLNKLKTHL . RSHTGEKPYVCEHEGCKNAFS
mGli2	428	Y E E QA . T S
hGLI1	279	LRFPKA . YMLVVMHRRHT PHK TFEG SYSRLN . KT . L . S YM . EH S F . NASDRAK . QN . T . SN KLE RYT
mGli3	589	NASDRAKHQNRTHSNEKPYVCKIPGCTKRYTDPSSLRKVKVTHGPEAHV TTKQRGMHPRPPPPRDSGSHSQRSPRPTQAGFGEQKELNST . TSKRE
mGli2	526 I D N . V . V . A . LLKEN . DNEA . AE . . GR PE . . SV . A . S . . SHTV .
hGLI1	375	DP . SLR . . VKTV . G DAH V HRDGP . PRAPSISTVEPKRE . REGGPIREES . LTV . EGAMKP P AQSSCSDHSPAG . AAN . DSGV
mGli3	688	ECLQVKTVAEKPMTSQSPGGQSSCSQSQSPI . SNYSN . SGLLEPLTDGGSDVLDLSDAIDET . PIMDSTISTATTALQARRNPAGTKWMEHIKLERLK
mGli2	622	D . HI . AI . T . SSGLC . S A EP . . LG . APN . D . M . M . G . GP . . LG . . T . LAD . C . GA . TSALA . PSTGG . L . KHMSTVHRF . QL . R . K . .
hGLI1	466	MTGNAGGST . DLSSLDEG . CIACTGL . TLRRL . E . LRL . DQ . HQLRPI . TRGLK . PLSLH . . GTTV . RRVGPPVS . ERRSSSSSSISSAYTVSRSS . A
mGli3	785	QVNGMF . PRLNPI . . LPSKAPAVSPLINGTQS . N . NNYS . SGGPGTLLPSRDLGVDFTVINTL . NRRDNTSTISSAYLSRRSSSGISPCFSSRRSS
mGli2	722	SLKDSC . SWAG . A . PHTRNTKLP . . PV . . SVLE . F . TG . G AG QRLELPEV . M . SQ . QE S M TV Y
hGLI1	563	SFFPPGS . PE . GASS . . GLM . . QHY . LRARYA . A . RGGGT . PTAASS . DRIGG . PMPWRSRAEY . PGYNP . AGVTRR . SDPAQAADPA . ARVQ . FK .
mGli3	878	EASQAEQ . RPQNVSVA . . DSYDPISTDASRSSEASQDGL . P . SLLSLTPVQYALKAKAYAAPTGGPPPT . LPHMERLSLKTSMALL . GEG . RDSGVTL
mGli2	818 FIG . L . . H . A . S CS . GG . E . N A N . R GLD . V . R . RL DAPE . ALPGAC
hGLI1	660	LGCVHTE . PTVAGGGQNF . P . I . T . VYSPQP . ITENAAMD . ARG . QEE . EVGTSMVGSLN . YMDF DT . YGGPEGAAAEYPGAR . P SLPLGPG
mGli3	971	PPVHP . PRRCSG G . GHTYRGRHLM . PHDALANSVRSDPVR . TVSENMSLARVQRFSSLSNFPNPPPSVEKRS . LVLQNYTRQESSQPRYF
mGli2	914	. HPLG GP PTYSH . H . G . A . AAPAF . . EGPN . S . T . A RPDPLI P H . THNM . . GS CADR . G HV . SHPSVD . NLT . NA
hGLI1	757 TNYG . NP . PQQ A . SYDPDTQETW . GEFPSHSLYPGPKALGG . Y . QCPR . EHYGQVQVKEQGC . VGSD . TGLAPC . NAHSEGGPHF . . LFS
mGli3	1061	QAS . PCPPSITENVALEALTMADANLNDELLPDDVVQY LNSQNTGYGQQLQSGISEDKVAHEPEDLDLAGLPDSHVQ . QEYPALEQ . PCSEGS
mGli2	1010	Y R N VM . VAAGV . GPGL . EC . . GLVEDELV PDDVVQ . IKAHTG . TLD . GIRQGY . TEGTGFPENSKLPS . FGLQGHRR . LAAAD .
hGLI1	850	HYPQ . S QYLQSGPYTQPPP . YLPSEPRPC . DF . SPTHSTGQ . KA . LVCN . V . SQ . ELLW . GGGREDA . AQEPSYQS . KFLG . S . VS . SRACA . VNTYG
mGli3	1155	KTDLPQWNEVSSGTSDLSSSKLCKGQQRPRQPRGFLYNNMNVHPHNL . WKVG . T GPAGGYQTLGE . NS STY . NGPEHF
mGli2	1102	NMG SAPGLGGCQL . YSP . . N . NKSMPVQWNEVSS . TVDALPTQVKPP . PFPH . S NL . VVQ . KPAF . GO . YPG . YN . QSV
hGLI1	950	PGFG . NLP . HK . GSYPTP . PCHENFVVGAN . ASH . AAAPRLLPPL . TCYGPL G . NPSGCFHEVGRGG LYPPPE . QVC . PLD . LLDL . TQLD .
mGli3	1232	AIHSGD . GLGTN GNTFHEO . PFKTQOY G . SQLNRQ . P LTSSALDHACGTGIGQSKLKGNSLQENGLLDFFLSVAPNELAGNTV
mGli2	1178 QSS G . LDS . Q PHLQLRGA . SASRGS Y . T . QP AAG . QCLGMSAAMSPQASYSQAHP . LSPNIVSG NQFSPSCS . MA
hGLI1	1050	V LDEPQ SPPSHDQR . SSG . TP PSGPPNAV . NM . V . L . SL . GETEF . N
mGli3	1312	NGMQTQDMGQGYIAHQLLSGSMHQHQPGRPGQVQLGQVATSHINIQGTESCLPQTQDNSSQP . SSM . A . IRGYQPCASVGGNRRQAMPGRNLTLLQOQQL
mGli2	1258	AKPSHLGLQ . MEVVNPATIMNG REHGVN . SS . AA . SQHPVLS . PQD . YQQ . SNLL HQPFMESQQAAGFLMQP PPLE . NTASRHGRVS
mGli3	1412	SDMSQSSRVNSIKMEAGQSQQLCSTVQNYSGQFYDQTMGFSQDRKAGSFS . LSDANCLLQGTCTENSELLSPGANQVTVSTVDSFESHLEGVQIDFDA
mGli2	1356	GQQQLYA . TTGA . VTSANQETAEMPKGPA . TMVSLAPQP DTGR . QDQNT . YYYGQIHMYEQNGCCPAVQ . QPP . PQACS IQPEP . PSPGVNQVS
mGli3	1511	IIDDGDHTSLMSGALSPSIIQNLSSHSSRLTTPRASLPFPLSMGTTNMAIGDM . SLLT . SLAEESKFLAVM
mGli2	1456	STV . SQLLEPPQIDFDA MDDGD FSGAL TLLHNSQNSRLTTPRN TLP . IPAGISNM GDMSSMLTSLAEESKFLNMT

Abb. 3.3.2: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des murinen Gli3 (mGli3), Gli2 (mGli2) und humanen GLI1 (hGLI1). Der Bereich der Zink-Finger ist durch Umrandung gekennzeichnet.

Vergleicht man hingegen verschiedene *Gli3*-Sequenzen (murin, human, Xenopus; s. Abb. 3.3.3), so wird schon auf cDNA-Ebene die hohe Konservierung von 83,9% (murin/human) bzw. 63,5% (Maus/Xenopus) deutlich. Diese hält auch bei den abgeleiteten Aminosäuresequenzen an (s. Abb. 3.3.4), so daß sich hier ebenfalls Werte von 83,5% (murin/human) bzw. 66,9% (Maus/Xenopus) ergeben. Im Bereich der Zink-Finger ergeben sich sogar Homologien von über 98%.

Auffällig ist, daß die Homologien zwischen den verschiedenen *Gli3*-Vertretern besonders hoch in den 5'- bzw. aminoterminalen Hälften der Sequenzen sind, was auf eine Bedeutung dieser Region für die Funktion der Gli3-Proteine hinweist.

```

mGli3 1 .....ATGGAGGCCCGAGCCACAGCTCTACGGCGACTGAGAGGAAGAAAGCTGAAAATTCATTTGGAAATGTCCACAGAA
hGli3 1 .....T.....C.....A.C.....A.A.....T.G.....A.T.G.CT...TC
XGli3 1 ATGGAAGCCCGAGTCCCCTAGC.CTACA.AAGT.AAA.G.AAAAGGTT.A.ACTCT.TAGTA...G.C.CTC.CGA.CA.AAGTCA.GAG.AAGCTG

mGli3 80 CAGATGTCAGGAGAGCCGCTCTAGTACCCTTCCAAATGAGGATGAAAGTCTTCCAGCAGATCTACCCGAGAGAGAAACCGCAATCATT
hGli3 80 .....G.....A.....T.....C.C.....T.....A.....
XGli3 101 TT.CCTCA..ACA.CTT..AAT.AGGA.GAA.GTC..GGAC.GACAT..C.C..AGAAA..AGA.A.GCCATTGCCAT.CAGCCTC.A.G.GG.CRAGG

mGli3 180 GCAGCCTCAGAGTGTGCAGGCTCAACAAAATCAGTGGAGGCCCTGACCTCTAGTGATGAGAGGGCTCGCTGATCAAGAAAGAGATCCATGGCCT
hGli3 180 .....A.....A.....C.....G.....G.....A.T.A.A.G.....C.....AT.....G.C
XGli3 201 T.TGG.A.A.TCAGCG.A.AG.C.TCT.C.TCA.....AT.A.A.A.G.AC.....A...

mGli3 280 CTACCACATCTGGCGAGCCCTCTCTCCCTTACCCTGGGACTGTGTTTGGCCATGGATCCCCGGAATGGCTACATGGAGCCTCACTACC_ACCCT_CCTC_
hGli3 280 ..G.G..G.....G.G..G.....C.....C.....A.....T.....C.....
XGli3 280 A.A.....TC.T.A.....AG.T.C.....G.C.....C.....TA.....T.T.A.T.....T.G.T.GA...G

mGli3 377 ATCTTTCCCTGCCTTCCATCTCTGTACCAATGTATGCCAGACATCATGAGGGCCGTACCATTATGATCCATCTCTCTATCTCCATTACATGTGCC
hGli3 377 .....G.....C.....G.....A.A.A.....A.A.....C.....GC.G.....
XGli3 380 .....G.....T.....G.....A.....AA.A.....A.A.....C.....GC.G.....

mGli3 477 TCTGCCTTATCTAGTAGCCGACGTATCCAGACTTGCCTTTCATAGGATCTCCCCACACCGTAATCCCAGCTGCAGCCTCAGAGTCCCCCTCAGCCCC
hGli3 477 ..C..C..CA.G.....T.....G.....C.....G.....T.T.C.....T.....T
XGli3 480 A.A.....G.A.C.....A.A.C.....TC.C.A..T.CC..A.T.T.TA.A...AG.CAGT.A.T.T...A.....T

mGli3 577 CCACACCCTACATCAACCCATATATGACTACATCCGCTCATGCACTGCAGCCCATCCCTCTCCATGATCTCTGTGCCCCGAGGGCTGAGCCCTACAG
hGli3 577 .....T.T.C.C.....T.....T.....C.....A.AA.....G.....T.....
XGli3 580 ..T.T.G.....GT.T.C.....A.TC.C.A.....C.A.G.T...A.G...T.T.A.C.....C.

mGli3 677 ATGCTCCCATCTGGAGTCAAGCCCTGCGGAATACTATCACAGATGGCTCTGTGACAGGCCAGCGCAGCCCTTATGACAGACATCTTCCCTCAGCTGC
hGli3 677 ..G.....A.....A.....A.....C.....A.T.....C.....TA.....G.A.A.....
XGli3 680 ..TC.A.....CA.T.....T.....T.C.....A.....A.....G.T.A.....A.....T.T.TT...A.CC...

mGli3 777 CACTGCTGGTGAGG_G.....GCCATCCATATGGATACCTTCATGCCATGGACAGCACCAGATTTCCAGCCCTAGGCTGTGAGCTAGGCCACGCCGA
hGli3 777 ..C..C..CA.G.....A.....A.T.....T.....T.....CT.....G.....
XGli3 780 A.....T.A.CTAA...C.T.....A.T.....G..T.AC.G..T...T.C.A.A...AC.A.A.T.C

mGli3 871 AAAGCTACACTGTCATATCGCCACTGTGACATCATAGCTTCGACCCTTACAGCATGATAAGAACATCCCTAACTCTTGGTTACAATCTCAATAATT
hGli3 871 .....A.....C.C.....T.....T.....G.G.T.C.....G.C.T.....
XGli3 880 ..GA.A.G...T...A.C.T.T.....T.T.C...A...TC.C.AC..T.A.T.TC.C...T...T.C.C.

mGli3 971 CCCGTAGCAGCTCTTACGCAAGTGGTTCCTATGGCCACTTATCGGCAAGTGAATCGACCCCTGCAATGAGCTTACCTACCCCTCCGCTCCTGTCTCT
hGli3 971 .....C.....T.....T.....C.....G.T.....T.T.....G.C.C.....
XGli3 980 ...C.....A.T.T...C.T.....C.G.A.C.....C...T.A.T...AT.TG.A...AGC.TA.C.A.....

mGli3 1071 TCA_C_ATGCATCAACAGATCCTAAGCCGACAGCAAGCTTAGGCTCCGCAATCGGACACAGCCCTCTCTCATCCACCTGCTCCAACATTCCAACA
hGli3 1071 C.....G.....A.G.....T.A.C.T.....A.....C.....T.....
XGli3 1080 ..G.AA.....TA.G.T.....C.A.....G.C.T.....A.TC.T...A.A.....TT.T

mGli3 1168 CAGAGACCTATCCCTGGGATTCCGACAGTTCTGAACCCCGCTCCAGGTCAGCTCTGGCCCTCTGAGTC_CTCA_CAGAGCAAGCCACAAGCGAGTCTG
hGli3 1168 ..G.....T.A.....C.T.G.....C.....A.....G.T.....
XGli3 1180 ..A.A.C.T...T.C.C.GT..T..T.A.G.....AT...A.A.G.TG.A.G...A.....C.T...A.

mGli3 1265 CAGTGAGCAGCACTGGTGGCCCTATGCATAAATAAGCGGTCGAAGTCAAGCCCTGATGAAGACCTCCCAGCCAGGGTCAAGGGCCAGCAGGAACAGCC
hGli3 1265 .....A.G.....C.C.A.....A.C.....A.C.....G.T.....G.....
XGli3 1280 ..C.....G.A.TAC...C.C.C.T..G.A.A.....T.AT.A...T.AG.GT.T.ATT...T...

mGli3 1365 GGAAGGAACAACCTTAGTCAAGGAGGAAGCGGACAAAGATGAAGCAAGCAGGACCTGAAGTCACTACGACACAAACTGCCACTGGGAAGGCTGCACC
hGli3 1365 C.....T.....G.....A.....A.....T.....G.....G.....
XGli3 1380 A.T...TG.T.G.A.....G.G.T.....T.A.A.G.....GG...T.....T.....TG

mGli3 1465 AGAGAGTTCGACACCCCAAGTACAGCTTGTGCATCATATCAATAATGACCACATTCATGGAGAAAAGAGGATTCGTGTGCCCTGGCTGATTTGTTCAC
hGli3 1465 ..G.....G.....C.....A.....C.....T.....G.....A.G.....G.C.C.A
XGli3 1480 C.....T...A.G.A.A.A.....C.....A.....G.A.....T...T.A.G.....A

mGli3 1565 GAGAGCAGAAACCGTTCAAAGCCCACTACATGTTGGTAGTGATAGAGAAGACACTGGGAGAAAGCCTCACAATGTACATTTGAAGGTTGCACAAA
hGli3 1565 .....C.....T.....G.....C.....C.....T.....G.....C.....T.....
XGli3 1580 .....A.G.....G.T...T.C...G.C.C.....T.A.A.A...A...C.T.....TT...

mGli3 1665 AGCCTACTCAAGACTCGAAAACCTGAAAACCCACTGAGATCTCACACTGGAGAGAAGCCATACGCTGTGAGCATGAGGGTGAACAAGGCTTTCTCT
hGli3 1665 G.....G.....A.....T.....A.....A.....C.A.T.....A
XGli3 1680 C.....C.....A.....T.....T.....C.....G.....A.....T.....A.C.T.A

mGli3 1765 AATGCTTCAGATCGGGCCAAGCACCAAAACAGAACACATTCCAATGAGAAAACCGTATGTATGAAAATCCCAGGCTGCATTAAGCGTTACACAGACCCCA
hGli3 1765 ..C.T...C...A.....G.....A.....G.....
XGli3 1780 ..A.T.CA.A.....G.C.C.T..A.C.....T...T...G.....G.T.A.A...T...T.

mGli3 1865 GCTCTCTCGGAAACACGTGAAGACTGTGCATGGCCCTGAGGCTCATGTTACCAAGAAGCAGCGTGGGACATGCACCCTCGGCCTCCACCCCGAGAGA
hGli3 1865 ..C.....T.....A.....A.....C.....G.....A.....C.T.....G.....
XGli3 1880 ..A.A.A.G.T.A.A.....T.A.....C.....A.A.....A.AA.....A.A...

mGli3 1965 TTCCGGCAGCCATTACAGTCCAGGTCCTTGGCCGCAACTCAGGAGCATTGTTGGTGAAGCAGAGGAGCTGAGCAACACTACCTCAAAGCGGGAAGAG
hGli3 1965 .....G.....A.G.....CC.....C.....C.....A
XGli3 1980 AC.A.A.....G.A.A.A.AA.AG.....TAT.CA..A...C...C.C.T.....AT...A

mGli3 2065 TGCCTCCAGGTGAAGACTGTCAAGGCTGAGAAGCCAATGACATCTCAGCCAAGCCCTGGTGTGAGTCTTTCATGAGCAGCCAACAGTCCCCCATCAGCA
hGli3 2065 .....A.C.....A.....A.....T.....A.....G.G.....
XGli3 2080 ..G.A.A.GAT.A.G.A.A.A.....T.....A.....G.G.....

mGli3 2165 ACTATTCCAACAGTGGGCTCGAGCTTCTCTGACTGATGGAGGTAGTGTAGCAGACCTCAGTCCATCGATGAAACCCCAATCATGGACTCGACCATTT
hGli3 2165 .....C.....A.....G.....A.....
XGli3 2180 ..A.....A.....AA.A.A.CAG...C..CA.T.G...T...C.A.....T.....

mGli3 2265 CACGGCAACCACAGCCCTTGCTTTGCAAGCCAGGAGAAACCCGGCAGGACCAAAATGGATGGAGCATCAAACCTGAAAGGCTAAAACAAGTGAATGGA
hGli3 2265 ..T.....G.A.....A.....G.A.....
XGli3 2280 ..C.....GA..G.A.C.GA...GGTTAT.A...A.....A.A.G...AAA.G...C...G

mGli3 2365 ATGTTTCCAAGACTGAACCTTATCTACCTCCAAGCCCTGCGGTATCTCTCTCATAGGAATGGCACACAGTCCAATAACAATATAGCTCGGGTG
hGli3 2365 ..GC.....C.....C.....C.....
XGli3 2380 ..C.....AG..C..TCAT.G.A.AA.TT.C.A.AA..CT...GTG..CTG.C.G...ATC.T.T..A.

mGli3 2465 GGCCCGGACCCTCTCCCGAGCAGAAAGTCACTGTGAGTGTAGACTTCCAGTGTGAACACACTCAACAGGAGAGACAGCAATACAGCACTATCAG
hGli3 2465 ..AT..G.T...G.....C.T.G.G..G..TA...TG...A.G...GCG...C...
XGli3 2480 ..ATTA.CAC.TG.A.T.A.A.....C...T.TA.CA.G.A.T...CT...T.TG.T...A...T...T.T.G.A.A.GGTT...A.A.

mGli3 2565 CTCTGCCTACCTGAGCAGCCGAGATCCTCGGGCATCTCCCTCTGCTTTTCCAGCCGAGTCCAGCAGGCGTCCAGGAGGAGGCGACCCAGCAAT
hGli3 2565 ..G.....C.....A.....G.....G.....C.....A.....C.....G.C.G.G.G...C
XGli3 2580 T.A...TA.....G.A.T.A.T.A.T.T...T.A.A...T...A.T...T.TT.G.A.A.GGTT...

mGli3 2665 GTGAGTGTGGTCTGACTCCTACGATCCCATCTCCACAGATGCTTCAAGAGGTTCCAGGAGGCCAGCCAGGTTGACGGCTGCCAGTGTCTCAGCCTCA
hGli3 2665 ..C.....C.....C.....C.....GC.CC.C...A.....A.C.....C.....
XGli3 2680 T.A...T.A.G...T...A.T.T.T...C...AC.T.A.T.AA.A...T...T...A.CC.C.T...A.

```


Rearrangements oder Punktmutationen geliefert, da keine RFLP gefunden wurden (Schimmang et al., 1994).

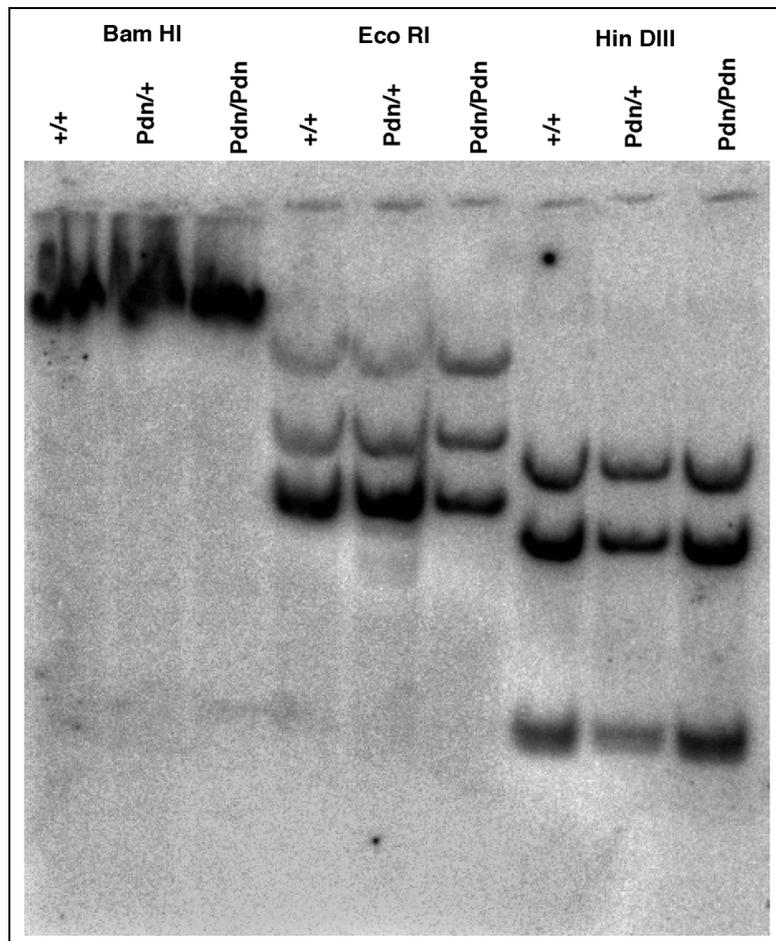


Abb. 3.4.1: Southern Blot-Analyse von Wildtyp-, *Pdn*^{+/+} und *Pdn/Pdn*-DNA. Die genomische DNA wurde mit den aufgeführten Enzymen gespalten, aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Als Beispiel ist hier das Ergebnis nach Hybridisierung mit dem Klon 5'gap1 (s. Abb. 3.2.2) dargestellt, bei der keine Unterschiede zwischen den drei Genotypen detektiert werden konnten.

Für die Hybridisierung von Membranen (s. 2.6.2., 2.6.4.) mit DNA der genannten drei Genotypen wurden daher alle neuen Klone eingesetzt. Auch mit diesen Sonden wurden jedoch keine RFLP festgestellt (s. Abb. 3.4.1), so daß davon ausgegangen werden konnte, daß in *Pdn*-Mäusen keine größeren Veränderungen der genomischen DNA stattgefunden haben.

3.5. UNTERSUCHUNG DER RNA-EXPRESSION

Da keine RFLP detektiert wurden, folgte nun die Analyse der *Gli3*-Expression auf RNA-Ebene. Auch diese Untersuchung war mit der 5'-Sonde (s. Abb. 3.2.2) bereits früher durchgeführt worden (Schimmang et al., 1994). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die keine Unterschiede in der Expressionsstärke und der Länge des Transkripts von Wildtyp-,

Pdn^{+/-} und *Pdn/Pdn*-Mäusen gezeigt hatten, wurden jedoch von einer japanischen Arbeitsgruppe in einem Übersichtsartikel in Frage gestellt (Naruse und Keino, 1995; s. 4.2.). Aus diesem Grund wurde die *Gli3*-RNA nochmals mittels Northern Blot- und RNase-Protektionsanalysen überprüft.

Totale RNA wurde aus Embryonen verschiedener Altersstufen (Tag 12.5, 14.5 und 15.5 p.c., jeweils Wildtyp, *Pdn*^{+/+} und *Pdn/Pdn*) isoliert, aufgetrennt, auf Membranen transferiert (s. 2.6.3.) und mit verschiedenen Sonden hybridisiert. Als Beispiel ist in Abb. 3.5.1 das Ergebnis einer Hybridisierung von RNA Tag 12.5 p.c. mit dem Klon 5'gapI (s. Abb. 3.2.2) dargestellt.

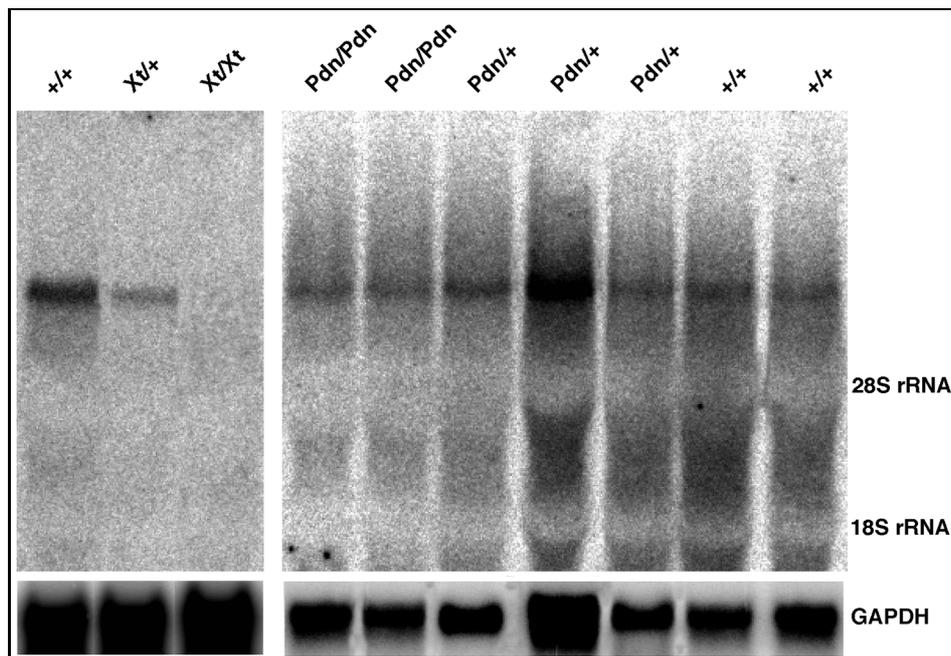


Abb. 3.5.1: Northern Blot-Analyse embryonaler RNA. Eingesetzt wurde RNA von Tag 12.5 p.c., als Sonde diente der Klon 5'gapI. In den ersten drei Spuren ist zusätzlich RNA von Embryonen aus einer *Xt*^{+/+} x *Xt*^{+/+} Kreuzung aufgetragen, um zu verdeutlichen, daß die Bande oberhalb der 28S rRNA die *Gli3*-spezifische Bande darstellt (keine *Gli3*-Expression in *Xt/Xt*-Tieren aufgrund einer Deletion (Schimmang et al., 1992; Hui und Joyner, 1993)). Zum Abgleich der aufgetragenen Mengen ist das Ergebnis einer Hybridisierung mit GAPDH aufgeführt.

In allen Spuren zeigt sich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen geladenen Mengen eine nahezu identische *Gli3*-Expression und eine übereinstimmende Länge der Transkripte. Mit den anderen Sonden und den RNAs anderer Altersstufen wurde die Analyse wiederholt und das gleiche Ergebniss erzielt. Damit ließen sich bereits durch die Northern Blot-Analysen die früheren Untersuchungsergebnisse bestätigen.

Zur Erhöhung der Sensitivität wurden RNase-Protektionsanalysen durchgeführt, die ebenfalls quantitative Aussagen erlauben. Dazu wurde wiederum totale RNA aus Embryonen verschiedener Altersstufen verwendet (Tag 13.5, 14.5 und 18.5 p.c., jeweils Wildtyp, *Pdn*^{+/+} und *Pdn/Pdn*). Als *Gli3*-Sonde wurde Pos. 1172-1651 (s. Abb. 3.2.3)

eingesetzt, die ein Fragment von 479 nt schützt. In Abb. 3.5.2 ist dies anhand von embryonaler RNA Tag 14.5 p.c. dargestellt.

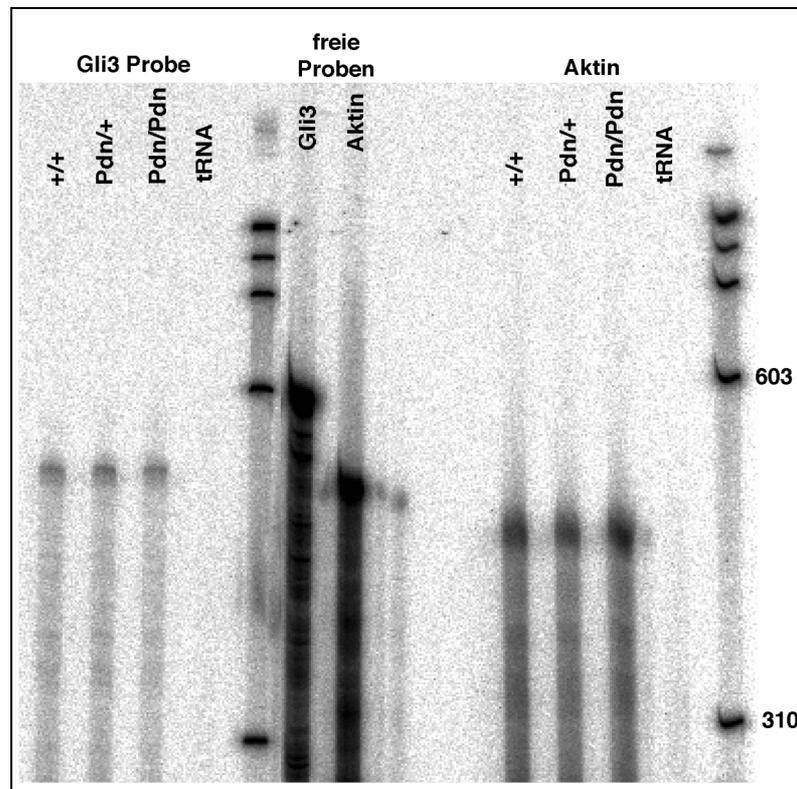


Abb. 3.5.2: RNase-Protektionsanalyse embryonaler RNA. Eingesetzt wurde RNA von Tag 14.5 p.c., die Probe (Pos. 1172-1651) schützt ein Fragment von 479 nt. Zum Abgleich der eingesetzten RNA-Mengen wurde eine Protektion mit einer Aktin-Probe durchgeführt, die ein Fragment von 420 nt schützt. Die freien Proben, die mitaufgetragen wurden, sind jeweils um die Entfernung vom genutzten Promoter (s. 2.6.5) zur Klonierungsstelle der Probe länger als das geschützte Fragment. Als Negativkontrolle wurde jeweils tRNA hybridisiert, als Längenstandard diente radioaktiv markierte ϕ X174-*Hae* III-DNA (s. 2.2.1.).

In allen untersuchten Altersstufen zeigte sich auch mit der RNase-Protektionsanalyse eine identische *Gli3*-Expression in Wildtyp-, *Pdn/+*- und *Pdn/Pdn*-Mäusen.

In Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Daten belegen die hier durchgeführten Analysen, dass das RNA-Expressionsniveau von *Gli3* in hetero- und homozygoten *Pdn*-Mäusen gegenüber Wildtyp-Tieren unverändert ist. Ebenso kann von einer einheitlichen Länge der Transkripte ausgegangen werden.

3.6. SEQUENZANALYSE DER *Gli3*-cDNA VON *Pdn*-MÄUSEN

In der Southern-Analyse wurden keine RFLP zwischen Wildtyp-, *Pdn/+*- und *Pdn/Pdn*-Mäusen detektiert. Desgleichen zeigte sich die *Gli3*-RNA sowohl in der Stärke der Expression als auch in der Länge der Transkripte zwischen den drei Genotypen als unverändert. Damit wurde eine Mikrodeletion oder Punktmutation als Ursache eines nichtfunktionalen *Gli3*-Proteins wahrscheinlich.

Folglich wurden nun die ca. 5 kb cDNA aus *Pdn/Pdn*-Tieren untersucht, die bereits für Wildtyp-Tiere ermittelt worden waren (s. 3.2.). Dazu wurde totale RNA aus MEF-Zellen von homozygoten *Pdn*-Mäusen revers transkribiert, mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die für die PCR verwendeten Primerkombinationen und die erhaltenen Produkte sind in Abb. 3.6.1 dargestellt.

Primerkombination	Produkt
ZF-F3/ZF-B5	ZF (683 bp)
NS350-F1/ZF-B1	c2 (1536 bp)
ZF-F3/B1	c3 (1785 bp)
3'F1/h3'B1	c4 (1820 bp)

Abb. 3.6.1: Primerkombinationen, die für die Amplifikation von *Gli3*-cDNA-Fragmenten aus *Pdn*-Mäusen eingesetzt wurden und erhaltenene PCR-Produkte.

Da eine Mutation im Bereich der Zink-Finger sehr wahrscheinlich einen deutlichen Einfluß auf die Funktionalität des Proteins haben würde, wurde dieser Bereich als erster analysiert. Es zeigte sich hier aber keine Abweichung zwischen der cDNA von Wildtyp- und *Pdn/Pdn*-Tieren. Daraufhin wurde die gesamte, bisher bekannte murine *Gli3*-cDNA untersucht. Alle eventuellen Punktmutationen, die in der *Gli3*-Sequenz von *Pdn*-Mäusen festgestellt wurden, erwiesen sich bei einer abermaligen Analyse (neue RNA, PCR und Sequenzierung) als Artefakte. Die *Gli3*-cDNA aus *Pdn*-Tieren zeigte also über den gesamten bekannten Bereich von ca. 5 kb die Wildtyp-Sequenz. Überraschenderweise wurde dann in einem anderen cDNA-Klon des gleichen RNA-Isolats eine unbekannte Sequenz von 168 bp gefunden, die zwischen cDNA-Pos. 538 und 539 integriert war (s. Abb. 3.6.2). Diese Entdeckung konnte bei erneuten Analysen mit RNAs aus anderen *Pdn*-Mäusen reproduziert (s. 3.7.) und auch durch eine RNase Protektionsanalyse (s. Abb. 3.7.15) bestätigt werden. Dies bedeutet, daß in *Pdn*-Tieren neben mutierten auch weiterhin Wildtyp-Transkripte erstellt werden.

```

AGTGTGCAGGGTCTCAACAAATCAGTGAGGAGCCCTCGAGCTCTAGTGATGAGAGGGCCCTCGCTGATCAAGAAGAGATCCATGGCTCTTACCACATCTGGCGGAGCCCTCTCCCT 480
S V Q G L N K I S E E P S T S S D E R A S L I K K E I H G S L P H L A E P S L P 103
TACCGTGGGACTGTGTTGCCATGGATCCCGAATGGCTACATGGAGCCTCACTACCCCTCGAGCGGCCTTCTCAGTCGAACCGTTCAGTTGCGAGCTGCTGGCGCCCAACATTTG 600
Y R G T V F A M D P R N G Y M E P H Y .....
P R A A F S V E P F T L R A A A G R N I L 143
      10      20      ETN      40      50      60
GCGCCTGAACAGGGACCTGAAGAATGGCAGAGAGATGCTAAGAGGAACGCTGCATTGGAGCTCCACAGGAAAGGATCTTCGTATCGGACATCGGAGCAACGGACAGACCCCTCATCTT 720
.....D P P H L 183
A P E Q G P E E W Q R D A K R N A A L E L H R K G S S Y R T S E Q R T
70      80      90      100      110      ETN 120      130      140      150      160
TTCCTGCCTTCCATCCTCTGACCAATTGATGCCAGACATCATGAGGGCCGTACCATATGATCCATCTCCTATTCCCTCATTACATGTGCCTTCTGCCTTATCTAGTAGCCCGACG 840
F P A F H P P V P I D A R H H E G R Y H Y D P S P I P P L H V P S A L S S S P T 223

```

Abb. 3.6.2: Auszug aus der murinen *Gli3^{Pdn}*-cDNA-Sequenz mit integrierter ETn-Sequenz. Dieses hybride Transkript wird nachfolgend als Spleißvariante 1 bezeichnet (s. Text). Die Integration von 168 nt ETn-Sequenz führt zu einer Verlängerung des längsten offenen Leserahmens (4914 statt 4746 nt) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz (1638 statt 1582 Aminosäuren), ohne das *Gli3*-Leseraster zu verändern.

Mit der unbekanntenen Sequenz von 168 bp wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sie Teil eines "Early Transposon" (ETn) ist, das in der Literatur bereits mehrfach beschrieben wurde (s.u.). Es handelt sich dabei um ein ca. 5,7 kb großes Retrotransposon, das in allen analysierten Fällen in ein Intron eines Wirtsgens integriert wurde. Als Folge konnte jeweils die Expression von unterschiedlichen hybriden Spleißvarianten von Wirtsgen und integriertem ETn festgestellt werden. Eine Integration von 168 nt in die RNA, wie hier für *Gli3* in *Pdn* ermittelt, wurde auch für das *Fas*-Gen in MRL-*lpr*-Mäusen beschrieben (Wu et al., 1993).

3.7. MOLEKULARE ANALYSE DER MUTATIONSFOLGEN

Aufgrund der Datenbanksuche ergab sich, daß bisher sechs unterschiedliche Spleißvarianten publiziert worden sind, die nach Integration des ETn in ein Intron eines Wirtsgens entstehen können (Shell et al., 1987; Weiss et al., 1989; Pratt et al., 1990; Steinmeyer et al., 1991; Chu et al., 1993; Kobayashi et al., 1993; Wu et al., 1993; Mitreiter et al., 1994).

In der Folge wurde analysiert, welche der Hybrid-RNAs in *Pdn*-Mäusen tatsächlich auftreten und welchen Anteil sie an der gesamten *Gli3*-Expression haben. Zudem wurde versucht, die ETn-Integration auf genomischer Ebene nachzuweisen.

Spleißvarianten

Eine PCR-Analyse wurde eingesetzt, um die verschiedenen potentiellen Spleißvarianten nachzuweisen, die sich nach den Datenbankergebnissen für *Gli3*^{*Pdn*} ergeben konnten (nachfolgend als Spleißvarianten 1-6 bezeichnet). Hierzu konnten auch für die ETn-Teile der erwarteten hybriden Transkripte Primer synthetisiert werden, da deren Sequenzen in Datenbanken vorhanden sind. Damit war es auch möglich, die Länge der PCR-Produkte zu berechnen, die sich für eine Spleißvariante ergeben mußten. Zur Analyse wurde totale RNA aus Wildtyp-, *Pdn*/+ und *Pdn/Pdn*-Embryonen revers transkribiert und für die jeweilige PCR verwendet. Als Primer wurden jeweils nur *Gli3*-spezifische eingesetzt oder ein ETn-spezifischer mit einem *Gli3*-spezifischen kombiniert, um eine Amplifikation von anderen ETn-Hybridtranskripten auszuschließen. Alle erhaltenen Produkte wurden durch eine Southern Blot-Analyse auf ihre Spezifität hin überprüft. Zudem wurden einige Produkte kloniert und sequenziert und dann als Sonden für RNase Protektionsanalysen eingesetzt (s.u.).

Spleißvarianten 1 und 2

Durch PCR mit verschiedenen Primerkombination (s. Abb. 3.7.1) und Southern Blot-Analyse der erhaltenen Produkte konnte neben der bereits bekannten Spleißvariante 1 (s. 3.6.) auch die Spleißvariante 2 für hetero- und homozygote *Pdn*-Mäuse gezeigt werden. Bei der Spleißvariante 2 handelt es sich um die Integration von 183 nt ETn-Sequenz in das *Gli3*^{*Pdn*}-Transkript. Die ETn-Sequenz ist dabei am 5'-Ende um 15 nt länger als in der

Spleißvariante 1, bei der 168 nt integrieren. Eine korrespondierende Spleißvariante 2, d.h. die Integration von 183 nt ETn-Sequenz in das *Fas*-Transkript, wurde auch für die bereits erwähnten MRL-*lpr*-Mäuse gezeigt (Chu et al., 1993; Kobayashi et al., 1993).

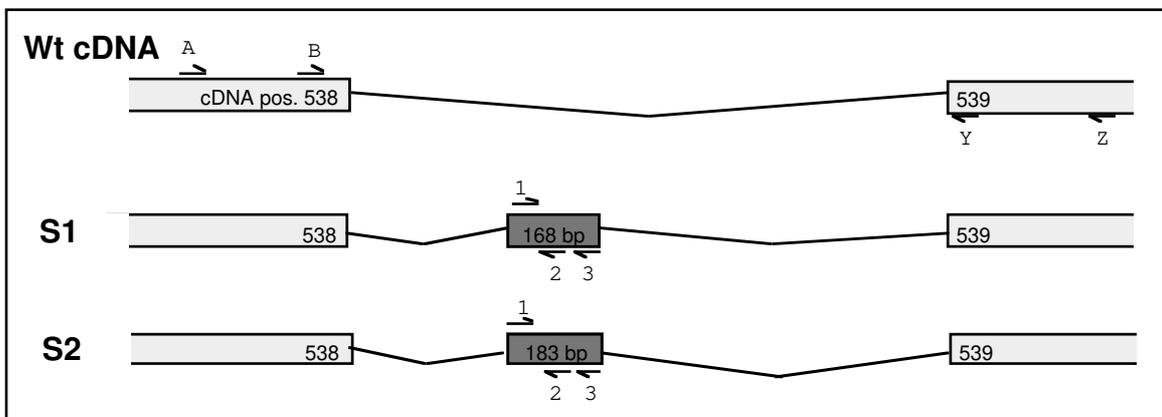


Abb. 3.7.1: PCR-Analyse der Spleißvarianten 1 und 2 (S1 bzw. S2). Oben dargestellt ist die Situation von *Gli3* in Wildtyp-Mäusen (Wt), darunter die sich durch das Spleißing von *Gli3^{Pdn}* ergebenden hybriden RNAs 1 und 2. Der ETn-Teil ist dabei dunkelgrau dargestellt. Die mit Buchstaben bzw. Zahlen markierten Pfeile stellen die Primer dar, die zur PCR-Analyse eingesetzt wurden. *Gli3*-spezifische Primer: A = F1, B = 5'F4, Y = 5'B3, Z = 5'B4. ETn-spezifische Primer: 1 = ETn For, 2 = ETn Back, 3 = ETn Back2 (Sequenzen siehe 2.4.1.).

Die bei einer PCR mit z.B. B/2 erwarteten Fragmentlängen von 171 bp bzw. 186 bp (Spleißvariante 1 bzw. 2) konnten detektiert und ihre Spezifität durch Hybridisierung mit einer ETn-spezifischen Sonde (PCR-Produkt mit Primern 1 und 3, das kloniert und sequenziert wurde) bestätigt werden. Die PCR-Produkte und das Ergebnis der Southern Blot-Analyse sind in Abb. 3.7.2 dargestellt, die Sequenz der *Gli3^{Pdn}*-Spleißvariante 2 in Abb. 3.7.3.

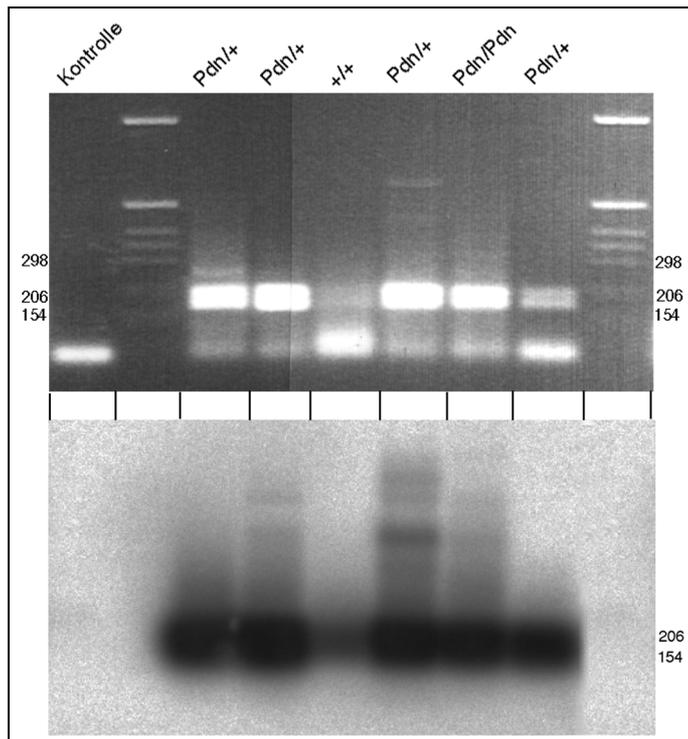


Abb. 3.7.2: PCR-Produkte aus Reaktion mit Primern B/2 und Ergebnis der Southern Blot-Analyse. Bei cDNA von hetero- und homozygoten *Pdn*-Mäusen konnten die erwarteten Banden von 171 bp für die Spleißvariante 1 und von 186 bp für die Spleißvariante 2 im Agarosegel detektiert werden, während von cDNA aus Wildtyp-Tieren keine hybriden Transkripte amplifiziert wurden (obere Darstellung). Dieses Ergebnis wird durch die Southern Blot-Analyse mit einer ETn-spezifischen Sonde (siehe Text) bestätigt, bei der nur in den *Pdn*-Spuren die entsprechenden Signale aufleuchten (untere Darstellung). Als Größenmarker wurde die Gibco-DNA-Leiter (s. 2.2.1.) mitaufgetragen.

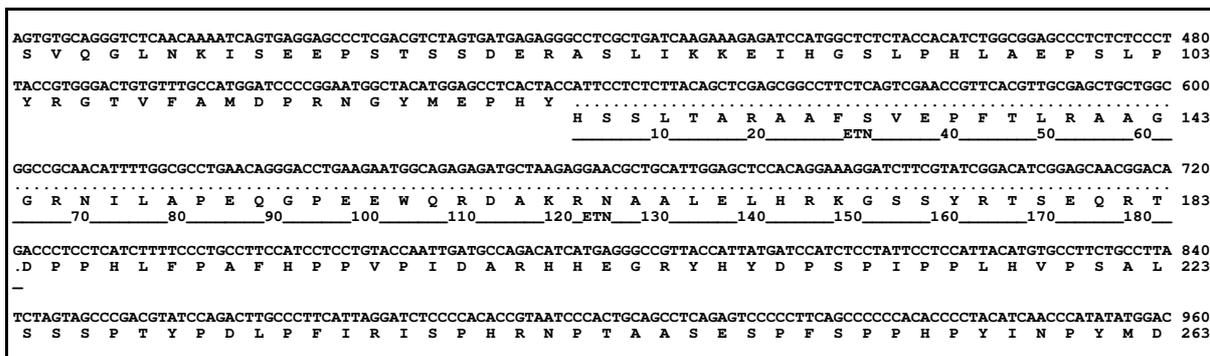


Abb. 3.7.3: Teilsequenz der Spleißvariante 2. Die *Gli3*-Sequenz ist nur auszugsweise dargestellt. Die Integration von 183 nt ETn-Sequenz führt zu einer Verlängerung des längsten offenen Leserahmens (4929 statt 4746 nt) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz (1643 statt 1582 Aminosäuren), ohne das *Gli3*-Leseraster zu verändern.

Spleißvariante 3

Bei dieser Spleißvariante konnten von *Gli3^{Pdn}* mit den Primerkombinationen 4/Y und 4/Z (s. Abb. 3.7.4) keine Fragmente amplifiziert werden, Kombinationen mit dem Primer 5

waren hingegen erfolgreich und konnten durch Hybridisierung mit der ETn-Sonde (s.o.) als spezifisch bestätigt werden.

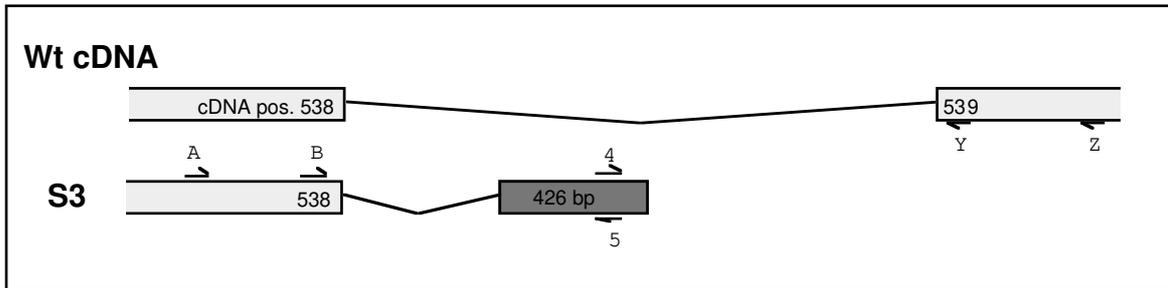


Abb. 3.7.4: PCR-Analyse der Spleißvariante 3 (S3). Oben dargestellt ist die Situation von *Gli3* in Wildtyp-Mäusen (Wt), darunter die sich für *Gli3^{Pdn}* ergebende hybride RNA 3 (abgeleitet nach Steinmeyer et al., 1991). Der ETn-Teil ist dabei dunkelgrau dargestellt. Die mit Buchstaben bzw. Zahlen markierten Pfeile stellen die Primer dar, die zur PCR-Analyse eingesetzt wurden. ETn-spezifische Primer: 4 = cDNA1 For, 5 = cDNA1 Back. *Gli3*-spezifische Primer siehe Abb. 3.7.1, Sequenzen aller Primer siehe 2.4.1.

Eine entsprechende Situation wurde bereits von Steinmeyer et al. (1991) für *Clc-1*/ETn-Transkripte in ADR-Mäusen beschrieben. Es wird daher angenommen, das auch in *Pdn*-Mäusen das integrierte ETn bei dieser Spleißvariante zu einem gegenüber der Wildtyp-RNA stark verkürzten, hybriden Transkript führt (s. Abb. 3.7.5).

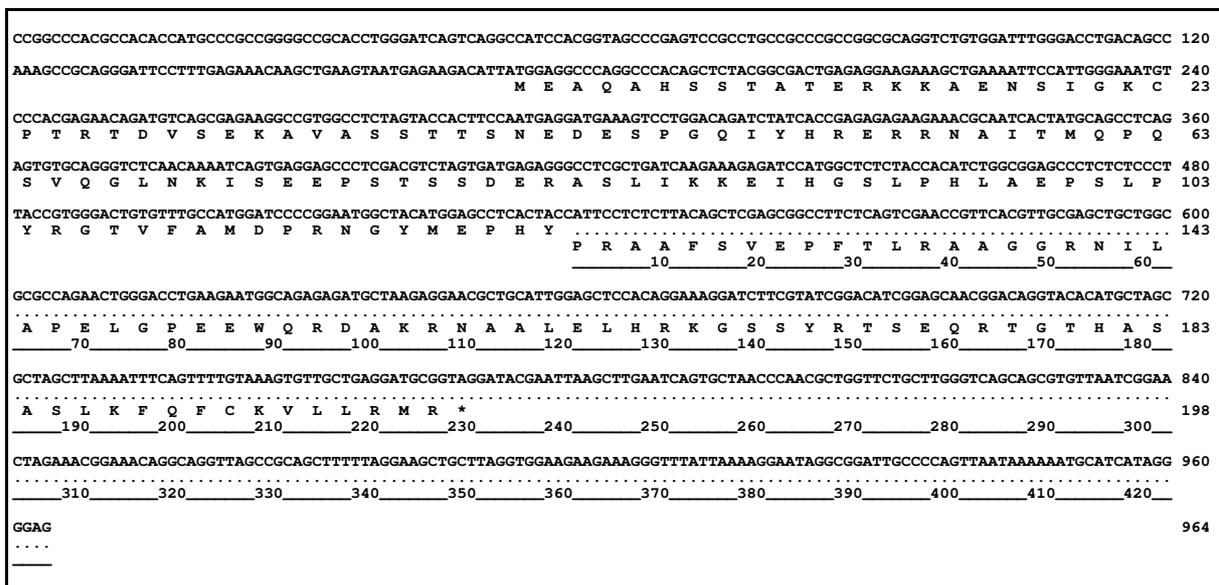


Abb. 3.7.5: Wahrscheinliche Sequenz der Spleißvariante 3. Für dieses hybride Transkript ergibt sich ein offener Leserahmen von 594 nt und eine abgeleitete Proteinsequenz von 198 Aminosäuren.

Das Produkt der PCR mit A/5 von *Pdn/Pdn*-cDNA (476 bp) wurde zusätzlich kloniert, sequenziert und für eine RNase Protektionsanalyse eingesetzt (s. Abb. 3.7.15). Hierdurch konnte abermals die Existenz des *Gli3*/ETn-Fusionstranskripts in *Pdn*-Mäusen nachgewiesen werden.

Spleißvariante 4

Durch eine PCR- und Southern Blot-Analyse konnte auch die Spleißvariante 4 in *Pdn*-Mäusen detektiert werden. Während Kombinationen mit dem Primer 6 erfolgreich waren, wurden mit den Primerkombinationen 7/Y und 7/Z keine Fragmente amplifiziert (s. Abb. 3.7.6).

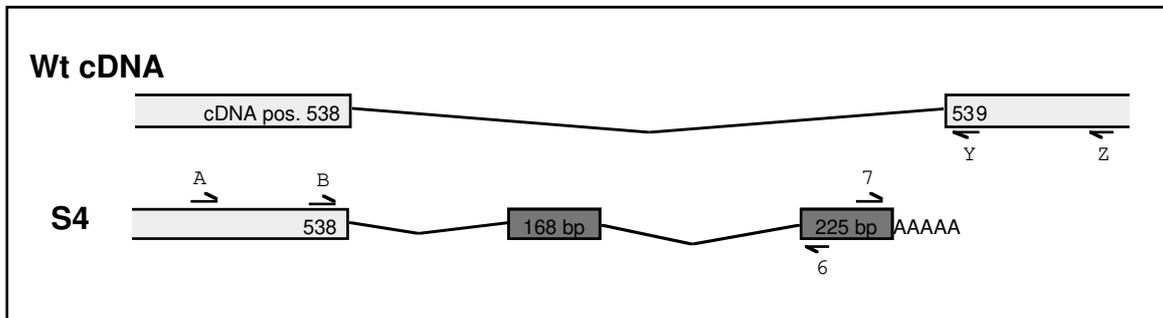


Abb. 3.7.6: PCR-Analyse der Spleißvariante 4 (S4). Oben dargestellt ist die Situation von *Gli3* in Wildtyp-Mäusen (Wt), darunter die sich für *Gli3^{Pdn}* ergebende hybride RNA 4 (abgeleitet nach Steinmeyer et al., 1991). Der ETn-Teil ist dabei dunkelgrau dargestellt. Die mit Buchstaben bzw. Zahlen markierten Pfeile stellen die Primer dar, die zur PCR-Analyse eingesetzt wurden. ETn-spezifische Primer: 6 = cDNA2/3 Back, 7 = U3 For. *Gli3*-spezifische Primer siehe Abb. 3.7.1, Sequenzen aller Primer siehe 2.4.1.

Die Produkte konnten sowohl anhand ihrer Größe als auch durch eine Hybridisierung mit der ETn-Sonde (s.o.) als spezifisch bestätigt werden. Dies ist in Abb. 3.7.7 für die Primerkombination A/6 (Produkt 495 bp) dargestellt.

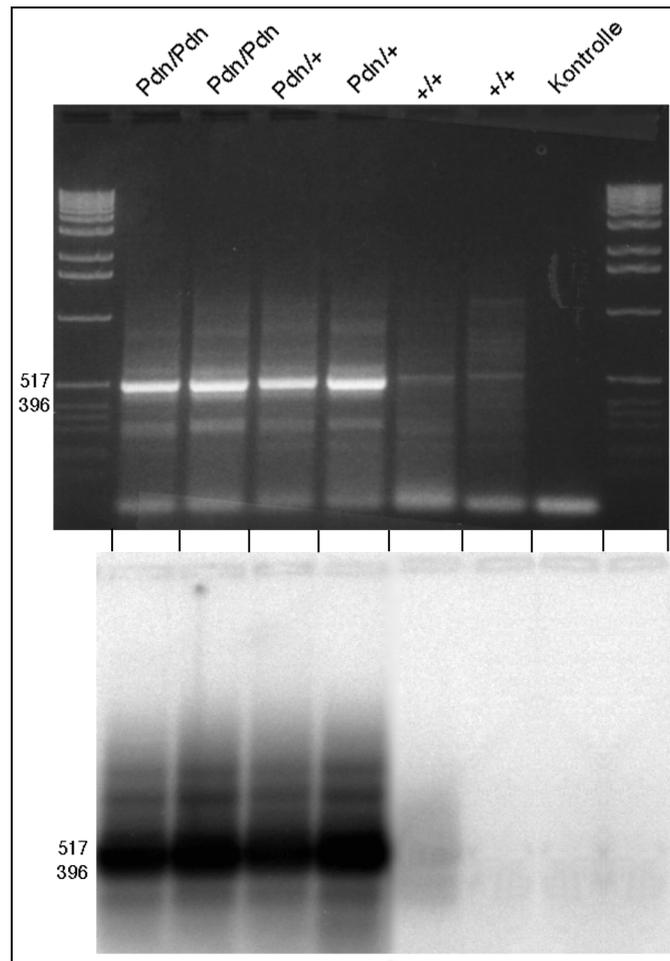


Abb. 3.7.7: PCR-Produkte aus Reaktion mit Primern A/6 und Ergebnis der Southern Blot-Analyse. Bei cDNA von hetero- und homozygoten *Pdn*-Mäusen konnte die erwartete Bande von 495 bp im Agarosegel detektiert werden, während von cDNA aus Wildtyp-Tieren keine hybriden Transkripte amplifiziert wurden (obere Darstellung). Dieses Ergebnis wird durch die Southern Blot-Analyse mit einer ETn-spezifischen Sonde (siehe Text) bestätigt, bei der nur in den *Pdn*-Spuren das entsprechende Signal aufleuchtet (untere Darstellung). Als Größenmarker wurde die Gibco-DNA-Leiter (s. 2.2.1.) mitaufgetragen.

Wiederum ist eine entsprechende Situation für *Clc-1*/ETn-Transkripte in ADR-Mäusen beschrieben worden (Steinmeyer et al., 1991). Davon kann abgeleitet werden, daß auch dieses Fusionstranskript gegenüber der Wildtyp-*Gli3*-RNA stark verkürzt ist (s. Abb. 3.7.8) und die ETn-RNA hier polyadenyliert wird.

CCGCCACACCCACCATGCCCCCGGGCCGACCTGGGATCAGTCAGGCCATCCACGGTAGCCCGAGTCCGCTGCCGCCCGCGCGAGSTCTGTGGATTGGGACCTGACAGCC	120
AAAGCCGACGGGATTCCTTTGAGAAACAAGCTGAAGTAATGAGAAGACATTATGAGAGCCAGGCCACAGCTCTACGGCGACTGAGAGGAAGAAGCTGAAAATCCATTGGGAATGT	240
M E A Q A H S S T A T E R K K A E N S I G K C	23
CCCACGAGAACAGATGTCCAGGAGAAGCCGCTGGCCCTAGTACCACCTTCCAATGAGGATGAAAGTCCCTGGACAGATCTATCACCAGAGAGAAGAACCGCACTACTATGCAGCCTCAG	360
P T R T D V S E K A V A S S T T S N E D E S P G Q I Y H R E R R N A I T M Q P Q	63
AGTGTGACGGGTCTCAACAAAATCAGTGGAGCCCTCGACGCTAGTATGAGAGGGCCCTCGCTGATCAAGAAAGAGATCCATGGCTCTCTACCACATCTGGCGGAGCCCTCTCCCT	480
S V Q G L N K I S E E P S T S S D E R A S L I K K E I H G S L P H L A E P S L P	103
TACCGTGGGACTGTFTTGCATGGATCCCAGGAATGGCTACATGGAGCCTCACTACCATTCTCTCTTACAGCTCGAGCGCCCTTCTCAGTCAACCGTTCAGTTGCGAGCTGTGGC	600
Y R G T V F A M D P R N G Y M E P H Y	
P R A A F S V E P F T L R A A G G R N I L	143
10 20 ETN 40 50 60	
GCGCCAGAACTGGGACCTGAAGAATGGCAGAGAGATGCTAAGAGGAACGCTGCATTGGAGCTCCACAGGAAAGGATCTTCGTATCGGACATCGGAGCAACGGACGGGAGGAGATGATGT	720
A P E L G P E E W Q R D A K R N A A L E L H R K G S S Y R T S E Q R T G R R C S	183
70 80 90 100 110 120 ETN 130 140 150 160 170 180	
CTCCCTCCCCCAGCCTGAAACCTGCTTGTCTGGGGTGGAGCTTCCTGCCTCATTCGTTCTGCACGCCCCACTGCTGGAACCTGAGGAGCCACACACGTCACCTTTCTACTGGACCAGA	840
L P S P Q P E T C L L G V E L P A H S F C H A H C W N L R S H T R A P F Y W T R	223
190 200 210 220 230 240 ETN 250 260 270 280 290 300	
GATTATTCGGCGGGAATCGGGTCCCTCCCTTCCTTCATAACTGGTGTCAACAATAAAATTTGAGCCTTGATCAGAAAAAAAAAAAA	931
D Y S A G I G S P P P S F I T G V T T I K F E P *	247
310 320 330 340 ETN_350 360 370 380 390	

Abb. 3.7.8: Wahrscheinliche Sequenz der Spleißvariante 4. Für dieses hybride Transkript ergibt sich ein offener Leserahmen von 741 nt und eine abgeleitete Proteinsequenz von 247 Aminosäuren.

Spleißvariante 5

Diese Spleißvariante wurde bereits zweimal als Resultat der Integration des ETn in ein murines Immunglobulin beschrieben: zum einen für das $\gamma 1$ -Gen im Plasmazytom P3.26Bu4 (Shell et al., 1987), zum anderen für das $\lambda 2$ -Gen in der Hybridoma-Zelllinie P3X63Ag8 (Weiss et al., 1989).

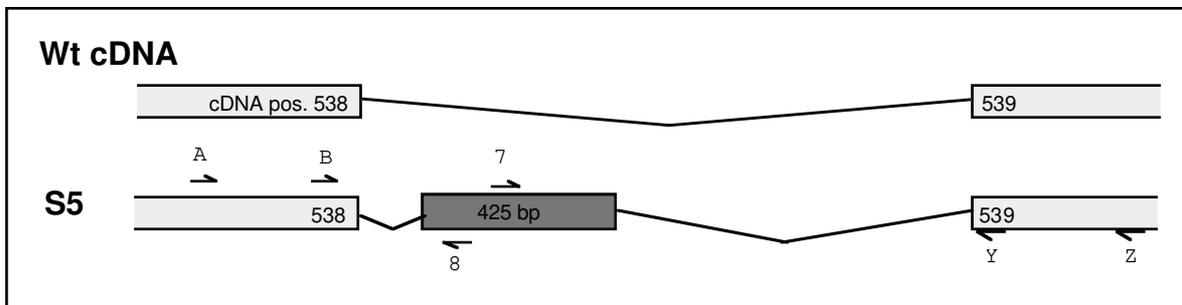


Abb. 3.7.10: PCR-Analyse der Spleißvariante 5 (S5). Oben dargestellt ist die Situation von *Gli3* in Wildtyp-Mäusen (Wt), darunter die sich durch das Spleißing von *Gli3^{Pdn}* ergebende hybride RNA 5. Der ETn-Teil ist dabei dunkelgrau dargestellt. Die mit Buchstaben bzw. Zahlen markierten Pfeile stellen die Primer dar, die zur PCR-Analyse eingesetzt wurden. ETn-spezifische Primer: 7 = U3 For, 8 = U3 Back. *Gli3*-spezifische Primer siehe Abb. 3.7.1, Sequenzen aller Primer siehe 2.4.1.

Mit Hilfe der Primerkombinationen 7/Y und 7/Z für die PCR (s. Abb. 3.7.10) und nachfolgender Southern Blot-Analyse der erhaltenen Produkte mit der ETn-spezifischen Sonde (s.o.) konnte schließlich auch die Spleißvariante 5 für hetero und homozygote *Pdn*-Mäuse gezeigt werden (s. Abb. 3.7.11). Die wahrscheinliche Sequenz dieses *Gli3^{Pdn}*-Mutantentranskripts ist in Abb. 3.7.12. dargestellt.

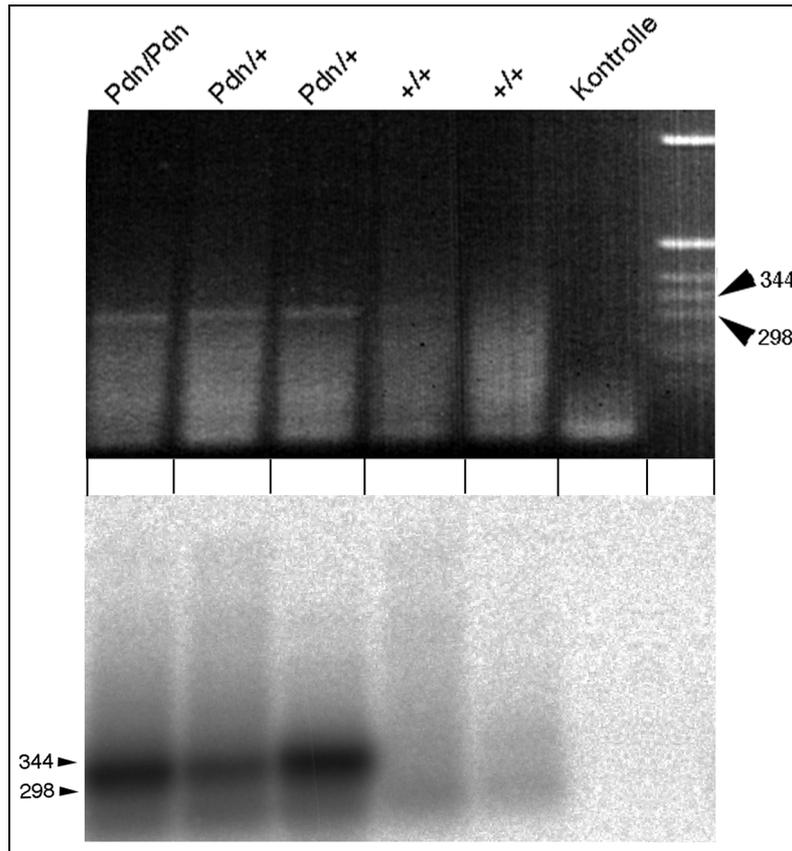


Abb. 3.7.11: PCR-Produkte aus Reaktion mit Primern 7/Y und Ergebnis der Southern Blot-Analyse. Bei cDNA von hetero- und homozygoten *Pdn*-Mäusen konnte die erwartete Bande von 323 bp im Agarosegel als schwaches Signal detektiert werden, cDNA aus Wildtyp-Tieren lieferte hingegen keine hybriden Transkripte (obere Darstellung). Dieser Befund wird durch die Southern Blot-Analyse mit einer ETn-spezifischen Sonde (siehe Text) bestätigt, bei der in den *Pdn*-Spuren das schwache Signal deutlich aufleuchtet (untere Darstellung). Als Größenmarker wurde die Gibco-DNA-Leiter (s. 2.2.1.) mitaufgetragen.

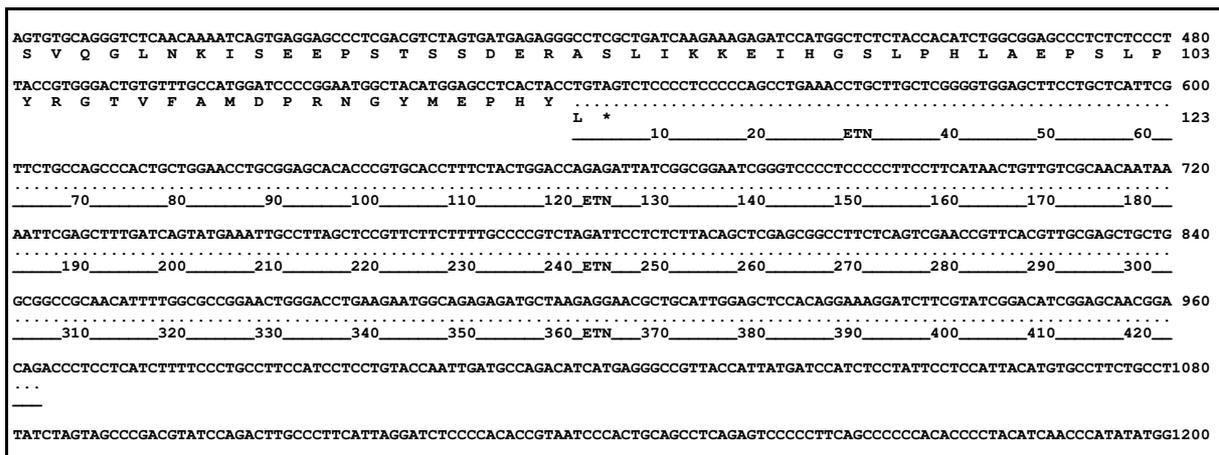


Abb. 3.7.12: Teilsequenz der Spleißvariante 5. Die *G/β*-Sequenz ist nur auszugsweise dargestellt. Die Integration von 425 nt ETn-Sequenz führt zu einer starken Verkürzung des offenen Leserahmens auf lediglich 369 nt und damit auch der abgeleiteten Aminosäuresequenz (123 Aminosäuren), da sich in der ETn-Sequenz in diesem Leseraster sofort ein Stopcodon (*) befindet.

Spleißvariante 6

Ebenfalls für den Muskel-Chlorid-Kanal *Clc-1* in ADR-Mäusen (s.o.) ist die Spleißvariante 6 beschrieben worden. Zudem zeigten Pratt et al. (1990) entsprechende α -Retinsäurerezeptor/ETn-Transkripte in einer murinen embryonalen Karzinoma-Zelllinie, als Folge der Integration des ETn in das entsprechende Gen.

Die PCR-Analyse mit den verwendeten Primerkombination (A/6, B/6, 7/Y, 7/Z) erbrachte kein für dieses mögliche *Gli3^{Pdn}*-Transkript erwartetes Amplifikationsprodukt, was durch eine Southern Blot-Analyse bestätigt wurde (als Sonde PCR-Produkt A/Y von Wildtyp-cDNA (Pos. 289-582) bzw. Klon 5'gapI, s. Abb. 3.2.2). Es konnten somit in den durchgeführten Untersuchungen keine Hinweise auf die Existenz einer sechsten Spleißvariante in *Pdn*-Mäusen gefunden werden.

Übersicht der nachgewiesenen Spleißprodukte

Fünf verschiedene hybride Transkripte wurden als Folge der Integration des ETn in *Gli3^{Pdn}* gefunden. Die fünf Spleißvarianten, die durch die oben aufgeführten Analysen nachgewiesen werden konnten, sind in Abb. 3.7.13 zusammengefaßt.

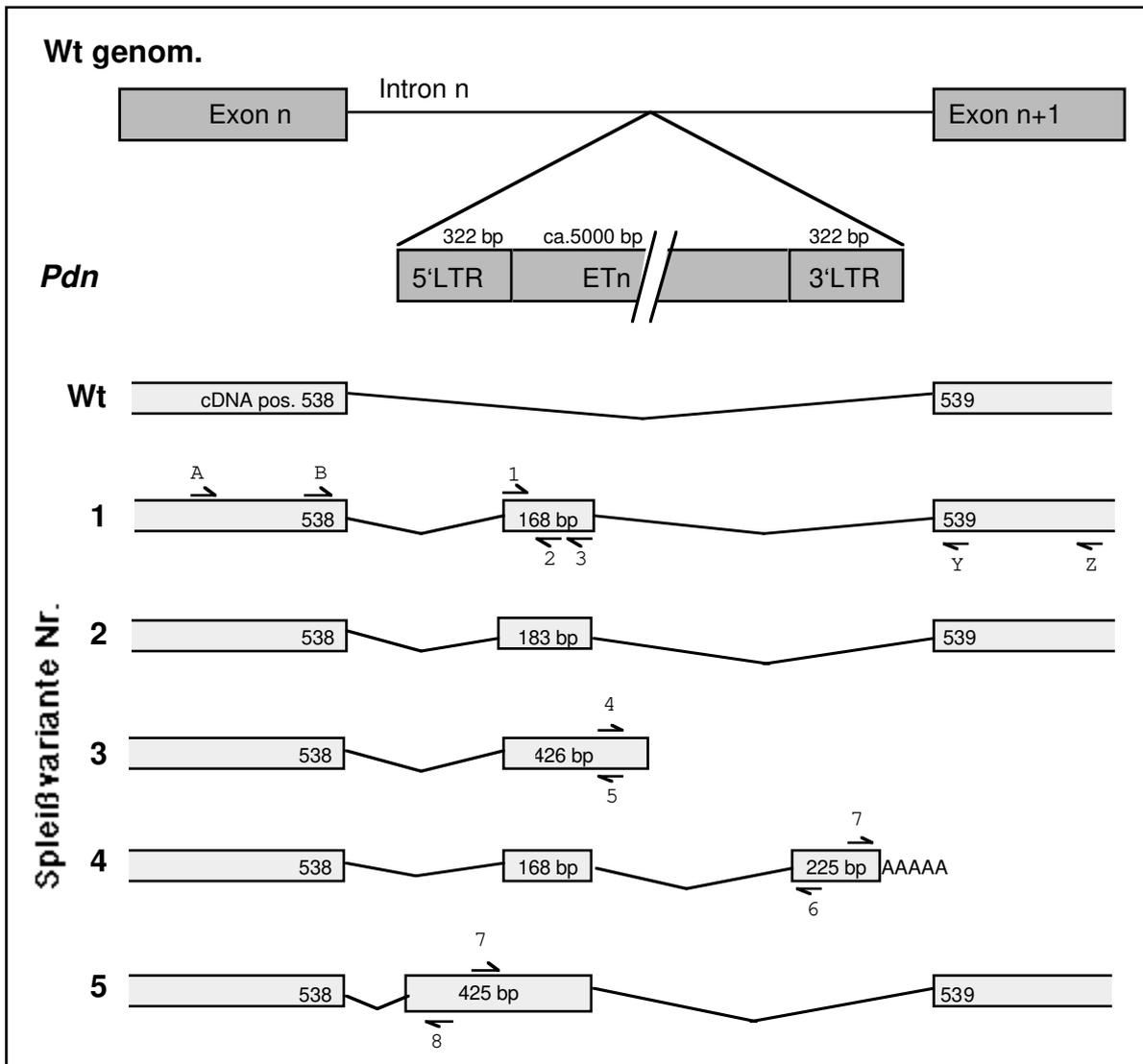


Abb. 3.7.13: Spleißvarianten von *Gli3^{Pdn}*, die in den durchgeführten Analysen detektiert werden konnten.

Oben ist die wahrscheinliche genomische Organisation der Integrationsregion dargestellt, unterhalb die detektierten Spleißvarianten in *Pdn*-Mäusen (Wildtyp (Wt) bzw. numeriert mit 1-5). Der Integrationsort des ETn in *Pdn*-Mäusen liegt bezogen auf die Wildtyp-cDNA zwischen Pos. 538 und 539. Die mit Buchstaben bzw. Zahlen markierten Pfeile stellen die Primer dar, die zur PCR-Analyse eingesetzt wurden. *Gli3*-spezifische Primer: A = F1, B = 5'F4, Y = 5'B3, Z = 5'B4. ETn-spezifische Primer: 1 = ETn For, 2 = ETn Back, 3 = ETn Back2, 4 = cDNA1 For, 5 = cDNA1 Back, 6 = cDNA2/3 Back, 7 = U3 For, 8 = U3 Back (Sequenzen siehe 2.4.1.).

Von großer Bedeutung ist die Frage, wie sich die ETn-Integration auf Struktur und Funktion der resultierenden *Gli3*-Proteine auswirkt. Die fünf unterschiedlichen Proteine, die von den Sequenzen der gefundenen Spleißvarianten abgeleitet werden können, sind in Abb. 3.7.14 dargestellt.

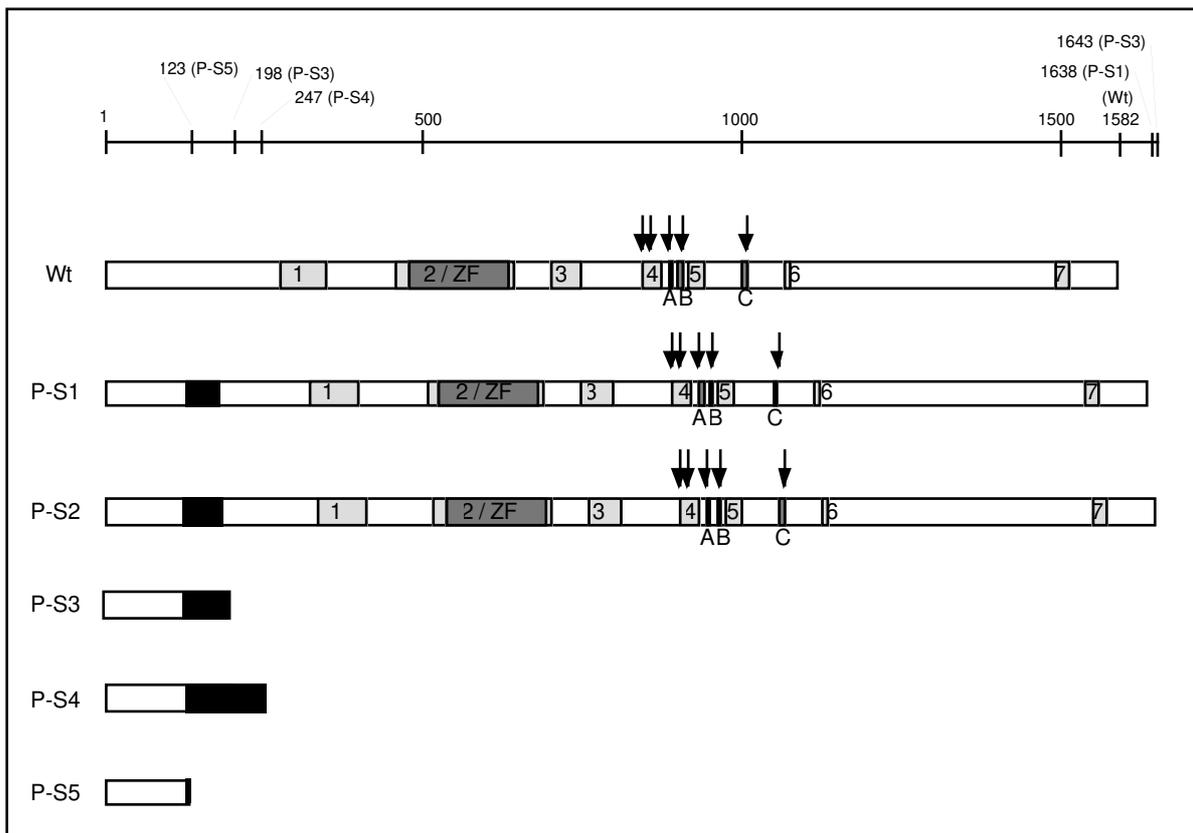


Abb. 3.7.14: Proteine, die sich von den Spleißvarianten von *Gli3^{Pdn}* ableiten. Ganz oben ist eine Skala aufgeführt, auf der die Längen der unterschiedlichen Proteine eingetragen sind. Darunter sind das Wildtyp-Gli3-Protein (Wt) und die Proteine der Spleißvarianten 1-5 (P-S1 usw.) dargestellt, die ETn-Anteile dabei jeweils in schwarz. Mit 1-7 und A-C sind Bereiche markiert, die innerhalb der *Gli*-Familie stark konserviert sind (s. 1.3.). Der Bereich 2 beinhaltet die Zink-Finger-Region (ZF, dunkelgraue Darstellung). Potentielle Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase A (Kennely und Krebs, 1991) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Integration des ETn in *Gli3^{Pdn}* führt bei den von den Spleißvarianten 1 und 2 abgeleiteten Proteinen zu Insertionen von 56 bzw. 61 Aminosäuren (P-S1 bzw. P-S2). Die Spleißvarianten 3, 4 und 5 resultieren hingegen in stark verkürzten Proteinen von 198 (P-S3), 247 (P-S4) bzw. 123 Aminosäuren (P-S5).

Aus der Darstellung wird deutlich, daß die Proteine der Spleißvarianten 3-5 nicht funktional sein werden, da bei ihnen nur noch ein rudimentärer Teil des Gli3-Wildtyp-Proteins vorhanden ist. Bei den Spleißvarianten 1 und 2 muß dies durch funktionelle Tests bestätigt werden. Ein erster Hinweis auf eine beeinträchtigte Funktionalität resultiert aus der Computerauswertung der von diesen beiden Spleißvarianten abgeleiteten Proteine. Mit dem Program MacVector (Vers. 4.5.1, Kodak Scientific Imaging Systems) wurde die Sekundärstruktur des Wildtyp-Gli3-Proteins und der Proteine der Spleißvarianten 1 und 2 nach dem Chou-Fasman-Algorithmus (Chou und Fasman, 1978) errechnet. In Abb. 3.7.15 ist das Ergebnis dieser Analyse für die ETn-Integrationsregion dargestellt.

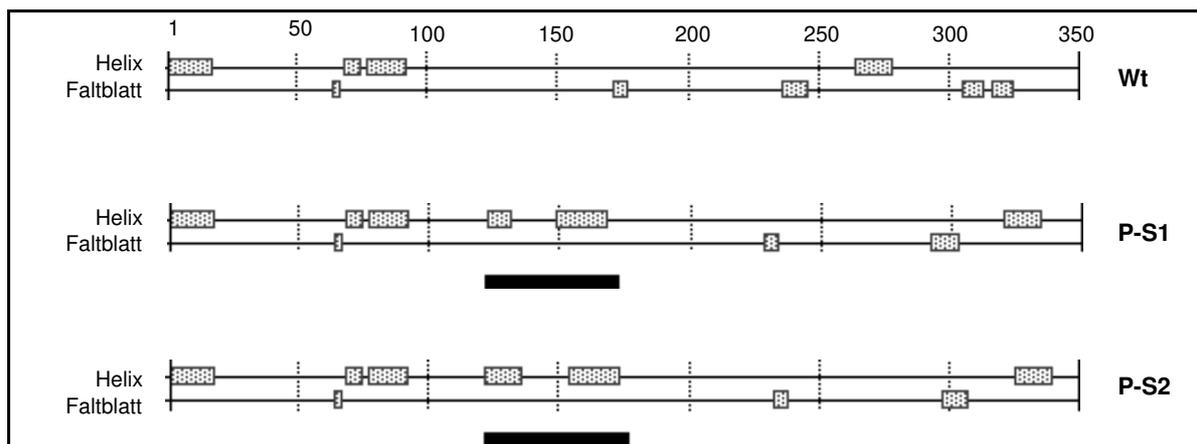


Abb. 3.7.15: Sekundärstruktur des Wt-Gli3-Proteins und der abgeleiteten Proteine der Spleißvarianten 1 und 2 (P-S1 bzw. P-S2). Dargestellt ist der Bereich der jeweiligen Aminosäuren 1-350, die ETn-Sequenz ist bei P-S1 und P-S2 zwischen Gli3-Pos. 122 und 123 integriert und jeweils mit einem schwarzen Balken unterlegt. In beiden mutierten Proteinen führt die Integration von ETn-Sequenz zur Ausbildung von α -helikalen Strukturen, während die β -Faltblattstruktur nicht beeinflusst wird.

Durch diese Daten wird deutlich, daß bei den Spleißvarianten 1 und 2 nicht nur zusätzliche Aminosäuren in die entsprechenden Proteine eingefügt und damit neue α -helikale Bereiche erzeugt werden, sondern auch die Sekundärstruktur dieser Proteine verändert wird.

Expression

Nachdem fünf verschiedene *Gli3*^{Pdn}-Mutantentranskripte in hetero- und homozygoten *Pdn*-Mäusen nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 3.7.13), mußte geklärt werden, welchen Anteil sie an der gesamten *Gli3*-Expression haben.

In der unter 3.5. beschriebenen Northern Blot-Analyse waren auch mit verschiedenen Sonden weder verkürzte *Gli3*-Transkripte noch Unterschiede in der Stärke der Expression zwischen +/+-, *Pdn*/+- und *Pdn*/*Pdn*-Tieren gefunden worden. Trotzdem wurde nach der Entdeckung der unterschiedlichen Spleißvarianten nochmals gezielt untersucht, ob sich divergierende Transkripte in *Pdn*-Mäusen durch Northern Blot-Analyse nachweisen lassen. Dazu wurden erneut Hybridisierungen mit Filtern von Wildtyp-, hetero- und homozygoter *Pdn*-RNA unterschiedlicher Altersstufen durchgeführt. Eingesetzt wurden hierzu Sonden, die sich 5' vom Integrationsort des ETn (cDNA Pos. 538) befinden, also verkürzte Transkripte detektieren sollten. Es konnten jedoch sowohl mit dem 5'-Klon (s. Abb. 3.2.2) als auch mit dem PCR-Produkt A/Y von Wildtyp-cDNA (s.o.) als Proben nur die bereits bekannte Transkriptlänge (s. Abb. 3.5.1) in den drei Genotypen gefunden werden.

Zur Erhöhung der Sensitivität wurden daher wiederum RNase-Protektionsanalysen durchgeführt. Dazu wurde totale RNA aus Embryonen verschiedener Altersstufen verwendet (Tag 12.5, und 14.5 p.c., jeweils Wildtyp, *Pdn*/+ und *Pdn*/*Pdn*). Als Sonden wurden zuerst die Spleißvariante 1 (aus PCR mit Primern A/3, s. Abb. 3.7.13) und die Spleißvariante 3 (Primer A/5) eingesetzt, um deren Anteile an der Expression von *Gli3*^{Pdn} zu ermitteln. Das Ergebnis der Analyse mit RNA vom Tag 12.5 p.c. ist in Abb. 3.7.16 dargestellt.

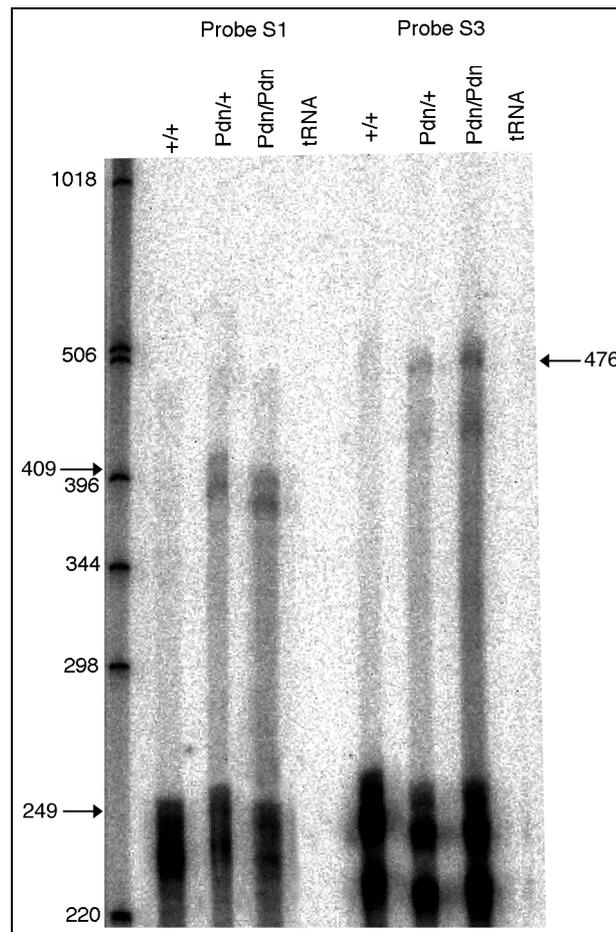


Abb. 3.7.16: RNase-Protektionsanalyse der Spleißvarianten 1 und 3. Die Probe der Spleißvariante 1 (S1; aus PCR mit Primern A/3) schützt ein Fragment von 409 nt des entsprechenden *Gli3^{Pdn}*-Mutantentranskripts, davon sind 249 nt *Gli3*-Sequenz, die auch in Wildtyp-Transkripten geschützt werden. Dasselbe gilt für die Probe der Spleißvariante 3 (S3; aus PCR mit Primern A/5): in Wildtyp-Transkripten werden ebenfalls 249 nt geschützt, während die Probe in *Gli3^{Pdn}*-Mutantentranskripten ein Fragment von 476 nt schützt. Beide Proben schützen in allen anderen Spleißvarianten ebenfalls die Pos. 289-538, so daß auch in den *Pdn*-Spuren geschützte Fragmente in der Größe von 249 nt gefunden werden. Als Negativkontrolle wurde jeweils tRNA hybridisiert, als Längenstandard diente radioaktiv markierte Gibco-DNA-Leiter (s. 2.2.1.). In beiden Untersuchungen wird in *+/+*-Tieren nur die Wildtyp-*Gli3*-RNA geschützt. In *Pdn*-Mäusen werden hingegen zusätzlich die jeweiligen *Gli3^{Pdn}*-Mutantentranskripte protektiert, die jedoch nur einen geringen Anteil der gesamten *Gli3^{Pdn}*-Expression repräsentieren.

Durch die Ergebnisse der Untersuchung wurde deutlich, daß diese beiden Spleißvarianten jeweils für sich nur einen geringen Teil der Expression des *Pdn*-Locus ausmachen, da die Signale der jeweiligen Spleißvarianten wesentlich schwächer sind als die der Wildtyp-Position. Weil die entsprechende Wildtyp-Sequenz aber auch in den anderen Spleißvarianten vorhanden ist (siehe Legende zu 3.7.16), kann mit dieser Analyse keine Aussage über den Gesamtanteil der fünf Spleißvarianten an der *Gli3^{Pdn}*-Expression gemacht werden.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Untersuchung mit einer anderen Sonde durchgeführt, die nur zwischen Wildtyp-RNA einerseits und allen Spleißvarianten andererseits unterscheidet. Hierzu wurde Pos. 289-582 eingesetzt (Primer A/Y). Die bei den jeweiligen

Spleißvarianten geschützten Fragmente sind in Abb. 3.7.17, das Ergebnis der Analyse mit RNA vom Tag 14.5 p.c. in Abb. 3.7.18 dargestellt.

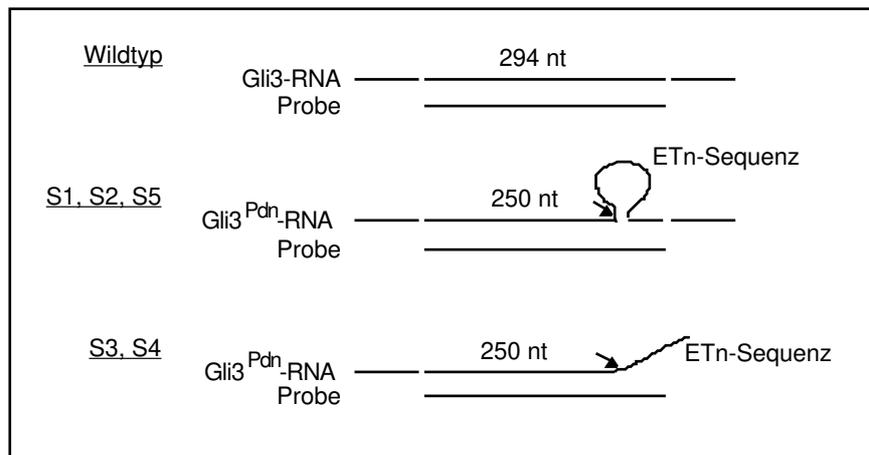
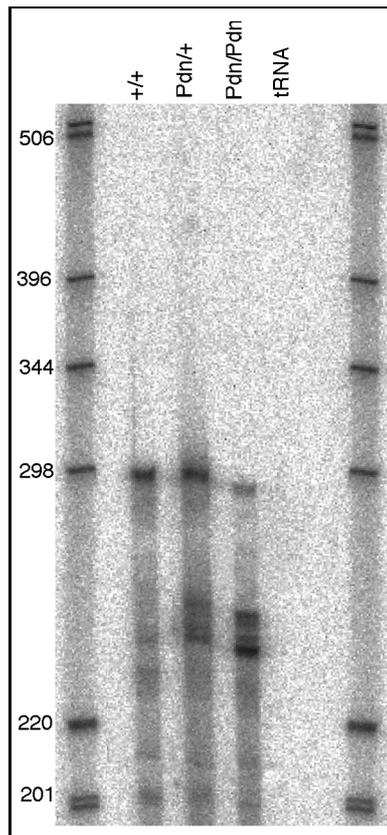


Abb. 3.7.17: Geschützte Fragmente bei einer RNase Protektionsanalyse mit der Probe A/Y (cDNA Pos. 289-582). In Wildtyp-Transkripten wird durch die Probe ein Fragment von 294 nt geschützt. In *Gli3^{Pdn}*-Mutantentranskripten wird hingegen ein Abschnitt von 250 nt protektiert (Pos. 289 bis zur Integrationsstelle des ETn, Pos. 538) und separat ein Fragment von 44 nt (5' von der Integrationsstelle des ETn, Pos. 539-582). Bei den Spleißvarianten 1, 2 und 5 (S1, S2, S5) formt die integrierte ETn-RNA mangels komplementärer Sequenz eine Schlaufe, so daß RNasen hier schneiden (Pfeil). Bei den Spleißvarianten 3 und 4 (S3, S4) wird nur die *Gli3*-RNA bis zum Beginn der ETn-Sequenz geschützt (Pfeil).



<i>relative Anteile an der Gesamtexpression in %</i>	<i>+/+</i>	<i>Pdn/+</i>	<i>Pdn/Pdn</i>
Wildtyp-<i>Gli3</i>-Transkripte (294 nt)	100	47	13
<i>Gli3</i>^{Pdn}-Mutantentranskripte (240-250 nt)	-	53	87
Verhältnis Wildtyp-/Mutantentranskripte	-	1 : 1,1	1 : 6,7

Abb. 3.7.18: RNase-Protektionsanalyse mit der Sonde A/Y (cDNA Pos. 289-582). In Wildtyp-*Gli3*-Transkripten wird ein Fragment von 294 nt geschützt, in *Gli3*^{Pdn}-Mutantentranskripten hingegen nur ein Abschnitt von 250 nt. Das im Bereich von 240-250 nt in den *Pdn/+*- und *Pdn/Pdn*-Spuren mehrere spezifische Banden auftreten, wird auf die Ausbildung der Schlaufenstruktur in den Spleißvarianten 1, 2 und 5 zurückgeführt (s. Abb. 3.7.17). Dadurch können einige Nukleotide des *Gli3*-Teils nicht mehr mit der Probe hybridieren, so daß die RNasen hier an unterschiedlichen Positionen schneiden. Als Negativkontrolle wurde tRNA hybridisiert, als Längenstandard diente radioaktiv markierte Gibco-DNA-Leiter (s. 2.2.1.). Wie erwartet wird in *+/+*-Tieren nur Wildtyp-*Gli3*-RNA gefunden, während in *Pdn/+*-Mäusen zusätzlich und in *Pdn/Pdn*-Tieren überwiegend verkürzte Transkripte detektiert werden. Die relativen Anteile der Wildtyp- und hybriden Transkripte nach Auswertung der Signalintensitäten mit dem Computerprogramm MacBas 2.0 (Fuji Photo Film Co.) sind in der Tabelle zusammengefaßt.

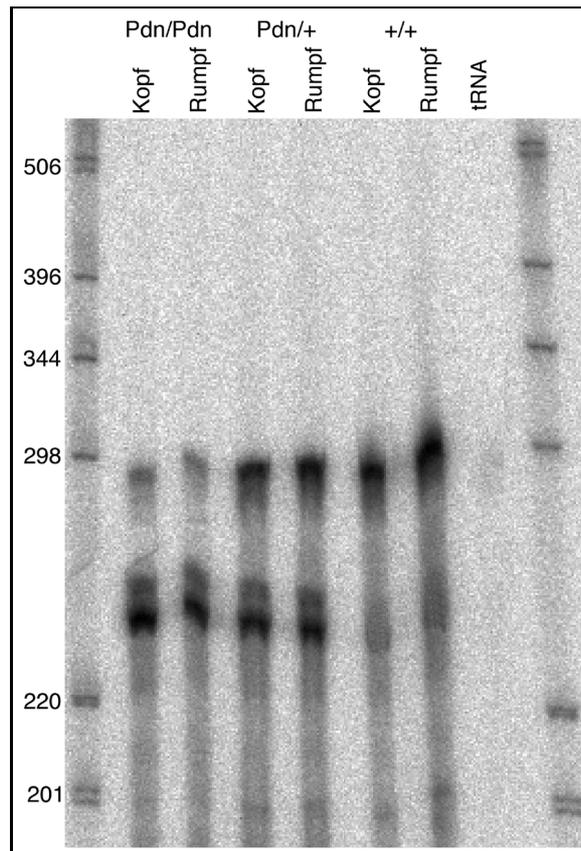
Durch diese Analyse konnten der Gesamtanteil der hybriden Transkripte an der *Gli3*-Expression in *Pdn*-Mäusen ermittelt werden. In heterozygoten Tieren beträgt der Anteil der *Gli3*^{Pdn}-Mutantentranskripte ca. 50%, während in homozygoten ca. 85% der Transkripte mutiert sind. Das bedeutet, daß bei *Pdn/+*-Tieren das Verhältnis von Wildtyp- zu

Mutantentranskripten noch ca. 1:1 ist, bei *Pdn/Pdn*-Mäusen aber sechsmal mehr hybride als Wildtyp-RNA von *Gli3^{Pdn}* erstellt wird.

Expression in embryonalen Strukturen

Bereits aus früheren Untersuchungen an Wildtyp-Tieren war bekannt, daß Differenzen in der Stärke der *Gli3*-Expression zwischen Organen auftreten (z.B. hohe Expression im Gehirn, niedrige in Leber, Lunge und Milz; Schimmang et al., 1992).

Um zu untersuchen, ob solche strukturspezifischen Expressionsunterschiede in *Pdn*-Tieren eine Rolle spielen, wurde erneut eine RNase Protektionsanalyse durchgeführt. Da *Pdn/Pdn*-Tiere nicht lebensfähig sind (s. 1.2.), wurde für die Analyse totale RNA jeweils aus Kopf und Rumpf später Embryonalstadien (Tag 17.5 p.c.) von *+/+-*, *Pdn/+*- und *Pdn/Pdn*-Embryonen eingesetzt. Als *Gli3*-Sonde wurde Pos. 289-582 eingesetzt (siehe dazu Abb. 3.7.17), das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 3.7.19 dargestellt.



<i>relative Anteile an der Gesamtexpression in %</i>	<i>Pdn/Pdn Kopf</i>	<i>Pdn/Pdn Rumpf</i>	<i>Pdn/+ Kopf</i>	<i>Pdn/+ Rumpf</i>	<i>+/+ Kopf</i>	<i>+/+ Rumpf</i>
Wildtyp-<i>Gli3</i>-Transkripte (294 nt)	16	18	47	53	100	100
<i>Gli3</i>^{Pdn}-Mutantentranskripte (240-250 nt)	84	82	53	47	-	-
Verhältnis Wildtyp-/Mutantentranskripte	1 : 5,3	1 : 4,5	1 : 1,1	1 : 0,9	-	-

Abb. 3.7.19: RNase-Protectioanalysis von Kopf/Rumpf von Wildtyp- und *Pdn*-Tieren mit der Sonde A/Y (cDNA Pos. 289-582). Auch hier wird in Wildtyp-*Gli3*-Transkripten ein Fragment von 294 nt geschützt, während in *Gli3*^{Pdn}-Mutantentranskripten ein Abschnitt von 240-250 nt protektiert wird (näheres im Text zu Abb. 3.7.17). Als Negativkontrolle wurde tRNA hybridisiert, als Längenstandard diente radioaktiv markierte Gibco-DNA-Leiter (s. 2.2.1.). Zwischen Kopf und Rumpf von Embryonen unterschiedlicher Genotypen können keine signifikanten Unterschiede in den relativen Anteilen von hybriden *Gli3*^{Pdn}- und Wildtyp-Transkripten gefunden werden. In Wildtyp-Tieren werden keine verkürzten Transkripte detektiert, während ihr Anteil von hetero- zu homozygoten *Pdn*-Tieren deutlich zunimmt (vergleiche Abb. 3.7.18). Die Signale zwischen Kopf und Rumpf von *Pdn/Pdn*-, *Pdn/+*- und *+/+*-Tieren sind jedoch jeweils nahezu identisch. Die Daten aus der Auswertung mit dem Computerprogramm MacBas sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Wie bei Wildtyp-Embryonen zeigt sich auch zwischen Kopf und Rumpf von *Pdn*-Embryonen kein Unterschied in der *Gli3*-Expression: während in Wildtyp-Kopf und Rumpf die normalen *Gli3*-Transkripte in ungefähr gleichen Anteilen exprimiert werden, verschiebt sich bei *Pdn/+*- und *Pdn/Pdn*-Tieren zwar das Verhältnis von Wildtyp- zu Mutantentranskripten, zwischen Kopf und Rumpf der jeweiligen Embryonen zeigen sich

aber keine Unterschiede. Weder bei Wildtyp- noch bei *Pdn*-Embryonen konnten somit in diesem Rahmen strukturspezifische Expressionsunterschiede festgestellt werden.

Desweiteren bestätigen die in der Tabelle zusammengefaßten Expressionsdaten die Ergebnisse, die aus der in Abb. 3.7.18 dargestellten Analyse gewonnen wurden.

3.8. *Gli3*-EXPRESSION IN HETEROZYGOTEN *Pdn*-MÄUSEN

Bei Kreuzungen von Wildtyp- mit heterozygoten *Pdn*-Mäusen (+/+ x *Pdn*/+) wurde beobachtet, daß die Transmission des Phänotyps sehr niedrig ist: deutlich weniger als die erwarteten 50% der Nachkommen zeigen den heterozygoten Gliedmaßen-Phänotyp (s. 1.2.). Damit kam die Frage auf, ob sich im Verhältnis von mutierten zu Wildtyp-Transkripten zwischen heterozygoten *Pdn*-Mäusen Abweichungen zeigen, so daß etliche *Pdn*/+-Tiere phänotypisch unauffällig bleiben.

Um diese Problematik aufzuklären, wurden Nachkommen aus +/+ x *Pdn*/+-Kreuzungen zuerst durch RT-PCR genotypisiert (s. 2.9.). Dabei wurde festgestellt, daß tatsächlich ca. 50% der Tiere eines Wurfs genotypisch heterozygot sind, obwohl nur ca. 25% den *Pdn*/+-Phänotyp zeigen. Ein Beispiel für eine solche Analyse ist in Abb. 3.8.1 dargestellt.

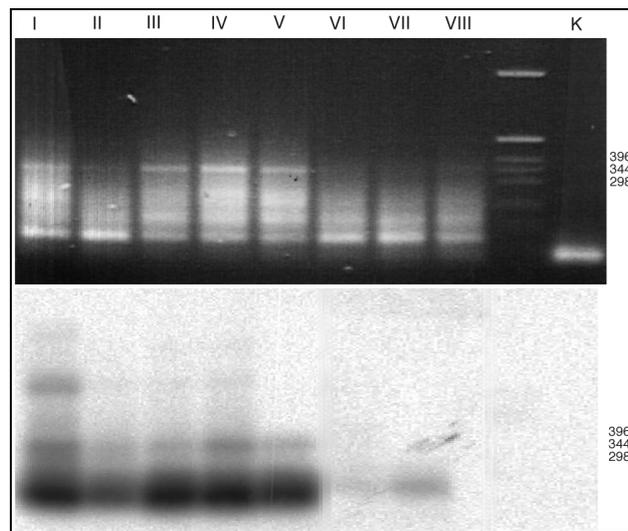
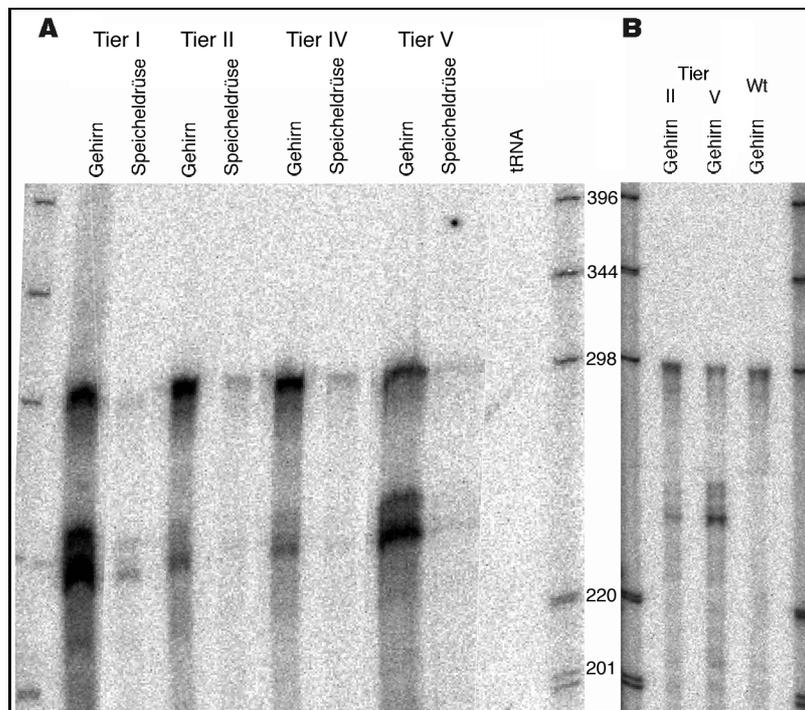


Abb. 3.8.1: PCR- und Southern Blot-Analyse der Nachkommen einer +/+ x *Pdn*/+-Kreuzung. Nach Schwanzbiopsien wurde aus dem Gewebe totale RNA gewonnen und eine reverse Transkription mit dem Primer Z sowie eine PCR mit der Primer-Kombination A/2 (s. Abb. 3.7.13) durchgeführt. Dabei wird nur in *Pdn*-Tieren eine Bande von 360 bp erwartet. Diese kann in den Spuren I-V detektiert werden (obere Darstellung; Signal in Spur II nur im Original-Photo deutlich), was durch eine Southern Blot-Analyse mit einer ETn-spezifischen Sonde (s. 3.7.) bestätigt wird (untere Darstellung). Damit konnten fünf der acht Tiere als *Pdn*/+ ermittelt werden, obwohl nur zwei Tiere (I und V) den heterozygoten *Pdn*-Phänotyp zeigen. Als Größenmarker wurde die Gibco-DNA-Leiter (s. 2.2.1.) mitaufgetragen.

Aus der in Abb. 3.8.1 aufgeführten Untersuchung wurden vier heterozygote Tiere ausgewählt, bei denen durch RNase Protektionsanalyse das Verhältnis von mutierten zu Wildtyp-Transkripten weiter aufgeklärt werden sollte: die Tiere I und II, beides Weibchen,

mit bzw. ohne Phänotyp und die Tiere IV und V, beides Männchen, ohne bzw. mit Phänotyp. Von diesen adulten Tieren wurde totale RNA aus Gehirn, Leber, Niere und Speicheldrüse gewonnen, als Sonde für die Protektionsanalyse wurde *Gli3*-Pos. 289-582 eingesetzt (siehe dazu Abb. 3.7.17). Das Ergebnis der Analysen ist für Gehirn und Speicheldrüse der vier Tiere in Abb. 3.8.2 dargestellt.



Signalintensitäten (absolut bzw. in %)	Tier I	Tier II	Tier IV	Tier V
Wildtyp-<i>Gli3</i>-Transkripte / Gehirn (294 nt)	1274 (100%)	1188 (100%)	1301 (100%)	1208 (100%)
<i>Gli3</i>^{Pdn}-Mutantentranskripte / Gehirn (240-250 nt)	3952 (310%)	1022 (86%)	1118 (86%)	3777 (313%)
Verhältnis Wildtyp-/Mutantentranskripte	1 : 3,1	1 : 0,9	1 : 0,9	1 : 3,1

Abb. 3.8.2: RNase-Protectioanalyse von Organen von Wildtyp- und heterozygoten *Pdn*-Tieren mit der Sonde A/Y (cDNA Pos. 289-582). In Wildtyp-*Gli3*-Transkripten wird ein Fragment von 294 nt geschützt, in *Gli3*^{Pdn}-Mutantentranskripten hingegen nur ein Abschnitt von 240-250 nt. (näheres im Text zu Abb. 3.7.17). Als Negativkontrolle wurde tRNA hybridisiert, als Längenstandard diente radioaktiv markierte Gibco-DNA-Leiter (s. 2.2.1.). **A:** Alle Tiere sind genotypisch *Pdn*+, phänotypisch aber unterschiedlich: während Tier II (weibl.) und IV (männl.) kein ersichtliches Merkmal heterozygoter *Pdn*-Tiere zeigten, wiesen Tier I (weibl.) und V (männl.) deutlich zusätzliche Zehenelemente an der anterioren Seite der Hinterläufe auf. Offenkundige Unterschiede konnten auch in den relativen Anteilen von Wildtyp- und hybriden Transkripten zwischen den Tieren festgestellt werden: Tier I und V besitzen deutlich höhere Anteile an mutierten Transkripten als Tier II und IV. Die Daten aus der Auswertung mit dem Computerprogramm MacBas sind in der Tabelle zusammengefaßt. **B:** Kontrollexperiment mit Gehirn-RNA eines Wildtyp-Tieres (Wt) und von Tier II und V.

Aus der Analyse geht hervor, daß starke Differenzen in der Menge von hybriden *Gli3^{Pdn}*-Transkripten zwischen unterschiedlichen heterozygoten Tieren bestehen. Während *Pdn/+*-Tiere ohne Phänotyp (Tier II und IV) nur geringe Mengen an mutierten Transkripten zeigen, sind diese bei heterozygoten *Pdn*-Mäusen mit Phänotyp (Tier I und V) deutlich stärker exprimiert.

Die Wildtyp-*Gli3*-Transkripte differieren in ihrer Expressionsstärke zwischen adulten, heterozygoten Tieren mit und ohne Phänotyp nur in geringem Umfang (s. Tabelle in 3.8.2), die Wildtyp-Menge wurde daher jeweils als 100% angesetzt. Die *Gli3^{Pdn}*-Mutantentranskripte weisen hingegen extreme Unterschiede in der Stärke der Expression zwischen diesen Tieren auf. Um diesen Befund zu quantifizieren, wurden die Signalintensitäten wiederum mit dem Computerprogramm MacBas ausgewertet. Bei Tieren ohne Phänotyp (II und IV) ist die Menge an mutierten Transkripten fast gleich mit der der Wildtyp-RNA, demgegenüber ist in Tieren mit Phänotyp (I und V) die Menge an Mutantentranskripten ca. dreimal so groß wie die der Wildtyp-RNA. Damit liegt das Verhältnis Wildtyp-/Mutantentranskripte bei *Pdn/+*-Tieren mit Phänotyp bei ca. 1:3, bei Tieren ohne Phänotyp hingegen bei ca. 1:1.

Die Expressionsunterschiede sind dabei unabhängig vom Geschlecht der heterozygoten Tiere (Tier I und II weiblich, Tier IV und V männlich).

3.9. GENOMISCHE ANALYSE

In allen veröffentlichten Untersuchungen, in denen das ETn in mutierten Genen lokalisiert werden konnte, wurde eine Integration in ein Intron gefunden (Shell et al., 1987; Herrman et al., 1990; Pratt et al., 1990; Steinmeyer et al., 1991; Adachi et al., 1993; Kobayashi et al., 1993; Wu et al., 1993; Chu et al., 1993; Mitreiter et al., 1994; Moon und Friedman, 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse kann auch für die *Pdn*-Mutante davon ausgegangen werden, daß die Integration des ETn in das *Gli3*-Gen in einem Intron erfolgt ist. In *Gli3^{Pdn}*-Transkripten liegt am Übergang der *Gli3*- zur ETn-RNA (*Gli3*-cDNA-Pos. 538) zwar nicht die vollständige Konsensus-Spleißdonorsequenz (AG, *Gli3^{Pdn}*: AC) vor, diese ist aber auch bei vier der anderen ETn-Insertionsmutanten nicht vorhanden (Shell et al., 1987: GC; Weiss et al., 1989: TA; Pratt et al., 1990: GG; Wu et al., 1993: CT). Dasselbe gilt für die entsprechenden Spleißakzeptorsequenzen der Wirts-RNAs bei den Spleißvarianten 1, 2 und 5 (Konsensus: GT; *Gli3^{Pdn}*: AC; *Fas* (Wu et al., 1993): GG; Ig γ 1 (Shell et al., 1987) und Ig λ 2 (Weiss et al., 1989): keine Daten).

Um die ETn-Integration in ein *Gli3*-Intron durch experimentelle Daten zu bestätigen, wurde eine weitere Southern Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA von *+/+/-*, *Pdn/+*- und *Pdn/Pdn*-Tieren mit verschiedenen, selten schneidenden Enzymen gespalten. Nach Übertragung auf eine Membran wurde mit zwei verschiedenen Sonden (PCR-Produkt A/Y (cDNA Pos. 289-582) und Klon 5'gapI, s. Abb. 3.2.2) hybridisiert. Eine ETn-

spezifische Sonde konnte hier nicht verwendet werden, weil ca. 200 Kopien des Gens im Maus-Genom vorhanden sind (Keshet et al., 1991). Da im Auftrennungsbereich eines Standard-Agarosegels von 0,1-50 kb kein unterschiedliches Bandenmuster festgestellt werden konnte, wurden Pulsfeldgelelektrophoresen zur Auftrennung bis ca. 600 kb durchgeführt. Es konnten jedoch auch hier nach den Hybridisierungen keine eindeutigen RFLP detektiert werden. Diese Daten deuten auf ein sehr großes Intron (> 100 kb) als Integrationsort des ETn hin.

Damit kann auch erklärt werden, daß bei PCR-Analysen mit keiner Primerkombinationen ein spezifisches Produkt erhalten werden konnte, wenn genomische DNA als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde.

4. Diskussion

Die *Pdn*-Mutante nimmt unter den Mausmutanten, bei denen das *Gli3*-Gen betroffen ist, eine gewisse Sonderstellung ein: im Gegensatz zu den *Xt*-Allelen, bei denen es sich um Deletionen handelt, und der Insertionsmutante *add* zeigen *Pdn*-Mäuse eine unveränderte Stärke der *Gli3*-Expression.

Da zudem bislang bei keiner dieser Mutanten eine genaue Definition der Mutation erfolgt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Mutation von *Gli3* im *Pdn*-Allel analysiert werden. Zunächst mußte auf der Basis der bereits vorhandenen partiellen cDNA-Informationen die Sequenz der murinen Wildtyp-*Gli3*-cDNA ermittelt und mit diesen neuen cDNA-Bereichen eine erneute Southern Blot-Analyse genomischer DNA von Wildtyp- und *Pdn*-Mäusen durchgeführt werden. In der Folge wurde dann durch Sequenzanalyse der *Gli3*-cDNA von *Pdn*-Mäusen die Mutation von *Gli3* in *Pdn* ermittelt. Schließlich konnte damit die Frage adressiert werden, wie sich die Mutation auf die Expression eines funktionellen Proteins auswirkt.

4.1. WILDTYP-SEQUENZ DES MURINEN *Gli3*

Sequenzhomologien innerhalb der *Gli*-Familie

Der Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten cDNA-Sequenz mit bereits bekannten Sequenzen von Mitgliedern der *Gli*-Familie konnte die Einordnung als murine *Gli3*-Sequenz bestätigen. Auf cDNA-Ebene fanden sich die höchsten Homologien zum humanen *GLI3* (83,9%) und zum *Gli3* aus *Xenopus* (63,5%), während die Homologien zum murinen *Gli2* und humanen *GLI1* wesentlich geringer waren (50,9 bzw. 24,4%). Die entsprechenden Werte für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen machten ebenfalls deutlich, daß es sich bei der neuen Sequenz um das murine *Gli3* handelt. Hier wurde noch offenkundiger, daß die Homologien zum humanen *GLI3* (83,5%) und zum *Gli3* aus *Xenopus* (66,9%) größer sind als zum murinen *Gli2* (35,7%) und humanen *GLI1* (14,0%).

Auch bei der Länge der Aminosäuresequenzen und dem berechneten Molekulargewicht der Proteine zeigen sich die höchsten Übereinstimmungen zwischen den *Gli3*-Vertretern. Sowohl das humane *GLI3* (1596 Aminosäurereste) als auch das murine (1582 Aminosäurereste) und das *Xenopus* *Gli3* (1569 Aminosäurereste) besitzen ein berechnetes Molekulargewicht von 173 kd. Demgegenüber beträgt das Molekulargewicht des murinen *Gli2* (1544 Aminosäurereste) 165 kd und das des humanen *GLI1* (1096 Aminosäurereste) 118 kd.

Sieben Regionen sind seit längerem bekannt, die innerhalb der *Gli*-Familie stark konserviert sind (Ruppert et al., 1990).

Die konservierte Region 2 beinhaltet den Bereich der fünf Zink-Finger, die zwischen der humanen GLI3- und der murinen Gli3-Sequenz zu 98,7% übereinstimmen. Die beiden abweichenden Aminosäuren befinden sich im Zink-Finger 1, der für die DNA-Bindungsspezifität nicht bestimmend ist (s. 1.3.). Dies gilt ebenso für den Zink-Finger 3, in dem zwischen murinem und *Xenopus*-Gli3 eine weitere Aminosäure differiert, so daß sich hier eine Homologie von 98,1% ergibt. Die Homologie zwischen dem Zink-Finger-Bereich des murinen Gli3 und Gli2 beträgt hingegen 92,4%, wobei Abweichungen in den Fingern 1-3 und 5 auftreten. Der Zink-Finger-Bereich des humanen GLI1 weicht über die ganze Sequenz stark von der des murinen Gli3 ab, so daß sich eine Homologie von lediglich 32,7% ergibt.

Auch potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A (Kennely und Krebs, 1991) sind zwischen den Gli-Proteinen konserviert, zwei davon befinden sich in der konservierten Region 4. Kürzlich wurden drei weitere Bereiche (A-C) beschrieben, die innerhalb der Gli3-Proteine und im Produkt des *Drosophila*-Gens *Cubitus interruptus* hochkonserviert sind (Marine et al., 1997). In jedem dieser drei Bereiche befindet sich eine weitere Erkennungssequenz für die Proteinkinase A.

Neben den Sequenzen dieser nun insgesamt zehn Regionen, die auch im murinen Gli3 erhalten geblieben sind, ist zudem ihre räumliche Anordnung als Merkmal für die jeweilige Zuordnung zu einer Untergruppe der *Gli*-Familie diskutiert worden (Marine et al., 1997). Dabei zeigen z.B. die Gli3-Proteine eine bestimmte Reihenfolge der konservierten Sequenzbereiche (1-4/A/B/5/C/6-7) und bestimmte Abstände zwischen diesen. Auch dieses Muster ist in der abgeleiteten Aminosäuresequenz der murinen *Gli3*-cDNA konserviert (s. Abb. 3.7.14).

In den 3'- bzw. carboxyterminalen Hälften der *Gli3*-Sequenzen zeigen fast ausschließlich die beschriebenen Regionen eine hohe Homologie. Dagegen ist auffällig, daß die Homologien zwischen den verschiedenen *Gli3*-Vertretern über die gesamten 5'- bzw. aminoterminalen Hälften der Sequenzen besonders hoch sind. Dies weist auf eine Bedeutung auch dieser Region für die Funktion der Gli3-Proteine hin.

Insgesamt konnte die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte murine cDNA damit eindeutig den *Gli3*-Sequenzen zugeordnet werden. Daneben wird durch die Ergebnisse die starke Konservierung innerhalb der *Gli*-Familie und innerhalb ihrer *Gli3*-Vertreter ein weiteres Mal bestätigt. Schließlich ergeben die Daten einen Eindruck davon, welche Bereiche der Proteine für ihre Funktionalität sehr wahrscheinlich entscheidend sind.

4.2. *Gli3*-ANALYSE IN DER *Pdn*-MUTANTE

Die *Pdn*-Mutante wird hervorgerufen durch die Integration eines Retrotransposons

Da eine verminderte Genexpression als Ursache für den Phänotyp von *Pdn*-Tieren ausgeschlossen werden konnte (s. 3.5.), wurde in der Folge der codierende Bereich von *Gli3*^{*Pdn*}-Transkripten untersucht. Alle eventuellen Punktmutationen, die dabei anfangs detektiert wurden, erwiesen sich nach wiederholten Analysen aber als Artefakte. Schließlich wurde in einem cDNA-Klon eine unbekannte Sequenz von 168 bp gefunden, die sich nach Datenbankanalysen als Teil eines "Early Transposon" (ETn) herausstellte. Der Befund einer ETn-Integration als molekulare Ursache für die *Pdn*-Mutante konnte in den nachfolgenden Untersuchungen bestätigt werden.

Retroelemente

ETn zählen zu der Gruppe der Retroelemente. Dieser Überbegriff steht für Sequenzen, die durch Retrotransposition, dem Umschreiben von RNA in DNA mit anschließender Integration in das Zellgenom, entstanden sind (Finnegan, 1985). Anhand struktureller Merkmale wie z.B. langen, terminal wiederholten Sequenzen ("Long Terminal Repeats", LTR) an beiden Enden des retroviralen Genoms, werden Retroelemente unterteilt in Retroviren, Retrotransposons (hierzu zählt auch das ETn) und Retroposons (Favor und Morawetz, 1992).

Retroviren sind RNA-Viren, die mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* ihr eigenes RNA-Genom unter Zuhilfenahme von Proteinen der Wirtszelle in doppelsträngige DNA umschreiben. Die virale DNA wird danach in das Zellgenom integriert und in dieser Form als Provirus bezeichnet (Boeke et al., 1985; Garfinkel et al., 1985). Die Familie der Retroviren wird in drei große Unterfamilien unterteilt, Onkoviren, Lentiviren und Spumaviren (Wilkinson et al., 1994). Eine Infektion mit exogenen Retroviren führt mit Ausnahme der Spumaviren zu einer Reihe von Erkrankungen, die Immunsuppression und/oder maligne Zelltransformation aufweisen.

Im Unterschied zu Retroviren sind Retrotransposons und Retroposons nicht infektiös und können keine kompletten retroviralen Partikel ausbilden. Retrotransposons weisen jedoch wie Retroviren die gleiche fundamentale Struktur mit flankierendem LTR auf, während diese bei Retroposons nicht vorhanden sind (Walchner et al., 1996). Die LTR sind für die Integration essentiell, da sie alle Signalstrukturen (z.B. Promotoren) enthalten, die die Expression der zwischen den beiden LTR liegenden Sequenzen steuern (z.B. Proteinexpression von *gag*, *pol* und *env* bei Retroviren).

Seit langem wird die Rolle von Retroelementen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen diskutiert (Leib-Mösch et al., 1990), da sie integrierte Bestandteile der Erbsubstanz sind und ein Reservoir an genetischer Information darstellen

(ca. 1% der genomischen DNA des Menschen). Durch ihre Eigenschaften als eine Art Provirus sind dabei heute zwei Modelle der Pathogenese vorstellbar: einerseits die Insertion in oder nahe eines Wirtsgens und damit dessen Funktionsänderung, andererseits die Expression von endogenen retroviralen Proteinen, welche als Autoantigen oder Superantigen fungieren können.

Für beide Modelle gibt es beim *systemischen Lupus erythematoses* (SLE) experimentell belegte Zusammenhänge. Im Genom von MRL-*lpr/lpr* Mäusen mit einer SLE-ähnlichen Erkrankung findet sich die Insertion eines ETn im zweiten Intron des *Fas*-Gens (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Dies führt zu reduzierter Apoptose, Lymphozytenakkumulation und erhöhter früher Mortalität der Mäuse. Zum Einen ist bei diesen Tieren die Expression von Wildtyp-*Fas*-Transkripten drastisch reduziert (s. u.), zum Anderen weisen bei murinem und humanem SLE Autoantikörper gegen körpereigene Proteine eine Kreuzreaktivität mit retroviralen Proteinbestandteilen auf (Blomberg et al., 1994).

Weitere Untersuchungen lassen die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen der Aktivierung endogener Retroelemente und murinen/humanen Erkrankungen erwarten.

ETn-Elemente

Die Charakteristika von ETn-Elementen, wie sie in MRL-*lpr/lpr* Mäusen und in *Gli3^{Pdn}* detektiert wurden, sind eingehend untersucht worden.

Der Name "Early Transposon" bezieht sich auf die starke RNA-Expression dieses Retrotransposons in einer murinen embryonalen Karzinomzelllinie, die ein frühes Stadium der Embryonalentwicklung repräsentiert (Brulet et al., 1983, 1985). Dabei wird von einem ETn-Promoter ausgehend eine polyadenylierte RNA von ca. 5,3 kb transkribiert, die nicht für ein Protein kodiert. Die ursprünglich angenommene Abhängigkeit der ETn-Expression vom Stadium der Entwicklung eines Organismus konnte in späteren Studien nicht bestätigt werden, so daß eine eventuelle entwicklungsabhängige Expression nun auf die Regulation des Wirtsgens zurückgeführt wird (Keshet et al., 1991).

Zwei murine ETn-Subfamilien wurden bisher beschrieben (Shell et al., 1990), die originale als MG1, die später entdeckte als γ M85 bezeichnet. Die ETn-Elemente dieser Familien sind über die Gesamtlänge von ca. 5,7 kb zu 94% homolog, wobei sich auf keinem der DNA-Stränge ein längerer offener Leserahmen befindet. Von den geschätzten 200 ETn-Elementen, die sich im Genom von BALB/c-Mäusen befinden (Sonigo et al., 1987), sind allerdings erst wenige vollständig sequenziert. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß einige doch für Proteine kodieren und damit ihre eigene Transposition katalysieren. Aller Voraussicht nach sind ETn dafür aber auf die Funktionen anderer Retroelemente angewiesen. Von den fünf weiteren Retrotransposon-Familien, die bisher beschrieben wurden, kommt jedoch nur die IAP-Familie ("intercisternal A-type particles") als Helfer für

die ETn-Transposition in Frage, da deren Mitglieder sowohl transkribiert als auch transponiert werden (Kuff und Lueders, 1989). Die restlichen Familien (GLN, MuRRS, MYS, VL30) besitzen wiederum keine hinreichend langen, offenen Leserahmen, um für Proteine zu kodieren (Keshet et al., 1991).

ETn-Sequenzen zeigen keine signifikanten Übereinstimmungen mit bekannten Retroviren und repetitiven Elementen von Säugetieren. Dies steht im Kontrast zu den perfekten retroviralen Eigenschaften der ETn-LTRs. Diese sind jeweils 322 bp lang und werden von einer 9 bp langen, invertierten Konsensus-Sequenz begrenzt. Dieser konservierte Bereich ist an der Integration des Provirus beteiligt (Panganiban und Temin, 1983). Die ETn-LTR-Sequenz wird in drei Domänen (U3, R, U5) von 192 bp, 12 bp und 118 bp eingeteilt (Kaghad et al., 1985), wobei sich in der U3-Region eine TATA Box-Sequenz und eine Polyadenylierungsstelle befindet. 16 bp 3' vom 5'-LTR beginnt eine Sequenz von 193 bp, die der L-Region von Retroviren entspricht. In diesem Bereich ist eine Spleißdonorsequenz vorhanden. Zudem wurde ermittelt, daß weitere Retrotransposon-Sequenzen als Promoter, Spleißstellen, Polyadenylierungssignale und transkriptionelle Enhancer fungieren können (Keshet et al., 1991) und damit das Expressionsmuster von Wirtsgenen beeinflussen.

Verschiedene Theorien bestehen zur Herkunft von Retrotransposons. Für ETn-Elemente werden dabei drei Möglichkeiten diskutiert: (a) Ableitung von Retroviren durch Degeneration deren interner Sequenzen, (b) Entstehung durch Rekombination zwischen zwei Retroviren oder (c) durch solitäre LTRs, die genomische DNA "eingefaßt" haben (Temin, 1980; Sonigo et al., 1987).

Folgen einer ETn-Integration

Nachdem in der RNA aus *Pdn/Pdn*-Mäusen ein hybrides *Gli3*/ETn-Transkript detektiert worden war, wurden Datenbankanalysen und Literatursuchen durchgeführt. Dadurch sollte ermittelt werden, ob zusätzliche Wirtsgen/ETn-Spleißvarianten bekannt sind. Tatsächlich sind insgesamt acht ETn-Integrationsereignisse und fünf weitere Spleißvarianten publiziert worden. Dabei werden von der integrierten DNA keine reinen ETn-Transkripte produziert, sondern unter der Kontrolle des Wirtspromoters werden vorwiegend hybride Transkripte und zu einem wesentlich geringeren Teil auch die jeweilige Wildtyp-RNA erstellt.

Bei der in der vorliegenden Arbeit zuerst detektierten Spleißvariante 1 handelt es sich um die Integration von 168 nt ETn-Sequenz in die *Gli3^{Pdn}*-RNA. Eine solche Integration ist bereits für das *Fas*-Gen in *MRL-lpr*-Mäusen beschrieben (Wu et al., 1993). Sie führt dort zu einer stark reduzierten Menge an normal gespleißter *Fas*-mRNA (2%). Die hybriden Transkripte kodieren hingegen für ein um 53 Aminosäuren verlängertes Protein, bei dem keine Verschiebung des Leserasters vorliegt.

Dies trifft auch auf die Spleißvariante 1 in *Pdn*-Mäusen zu: die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt keine Verschiebung des Leserasters, so daß auch hier ein um 53 Aminosäuren verlängertes Protein entstehen sollte.

Das in das zweite Intron des *Fas*-Gens integrierte ETn gehört zur Subfamilie γ M85, da die 168 nt zu 98% homolog mit der entsprechenden γ M85-Sequenz sind, während die Homologie zur Sequenz der MG1-Subfamilie nur 51% beträgt.

Die in der *Gli3^{Pdn}*-Spleißvariante 1 integrierte ETn-Sequenz ist zu 99% homolog mit der in den hybriden *Fas*/ETn-Transkripten. Somit ist auch in das *Gli3*-Gen von *Pdn*-Mäusen ein ETn der γ M85-Subfamilie integriert.

Die Spleißvariante 2 entsteht durch die Integration von 183 nt ETn-Sequenz in die Wirts-RNA, wobei die ETn-Sequenz am 5'-Ende um 15 nt länger als in der Spleißvariante 1 ist. Wie hier bei *Pdn*-Mäusen wurden solche Mutantentranskripte wiederum für das *Fas*-Gen von MRL-*lpr*-Tieren gezeigt (Chu et al., 1993; Kobayashi et al., 1993). Die Autoren beschreiben dabei eine ca. 10-fache Reduktion der Wildtyp-Menge an *Fas*-mRNA. Auch hier wird von den chimären *Fas*/ETn-Transkripten ein Protein ohne Leserasterverschiebung produziert, das um nun 61 Aminosäuren verlängert ist.

Ebenfalls für das p53-Gen einer murinen Osteosarkoma-Zelllinie ist eine entsprechende Spleißvariante 2 publiziert worden (Mitreiter et al., 1994). Hier resultiert aus der Integration des ETn in das Intron 4 gleichermaßen ein um 183 nt verlängertes Fusionstranskript und ein um 61 Aminosäuren größeres Protein, da auch hier keine Verschiebung des Leserasters auftritt. Auch hier wird von einer starken Reduktion der Wildtyp-Transkripte ausgegangen, da bei Northern Blot-Analysen keine entsprechende RNA detektiert werden konnte.

Die Spleißvariante 2 von *Gli3^{Pdn}* resultiert in einem Mutantentranskript, bei dem im *Gli3*-Leseraster 183 nt ETn-Sequenz integriert sind, so daß hier ebenso ein um 61 Aminosäuren größeres Protein kodiert wird.

Die Spleißvariante 3, bei der ein stark verkürztes Fusionstranskript entsteht, wurde zuerst für ADR-Mäuse beschrieben (Steinmeyer et al., 1991). Dort ergeben sich als Folge der ETn-Integration in ein Intron des Gens des bedeutendsten Skelettmuskel-Chloridkanals der Mammalia (*Clc-1*) insgesamt drei unterschiedliche hybride Transkripte, deren komplementäre DNAs in den Untersuchungen als cDNA1-3 bezeichnet wurden. Bei der cDNA1 (entsprechend Spleißvariante 3) werden an ein *Clc-1*-RNA-Fragment 426 nt ETn-Sequenz angehängt. Von diesen 426 nt entsprechen die ersten 168 nt denen, die auch in den Spleißvarianten 1 und 2 enthalten sind, darauf folgen 258 nt aus der inneren ETn-Sequenz.

Die cDNA2 (entsprechend Spleißvariante 4) besitzt am 3'-Ende der *Clc-1*-RNA wiederum die beschriebenen 168 nt, hier folgen dann aber weitere 225 nt aus der Region des ETn-3'-LTR.

Auch in der publizierten cDNA3 findet sich Sequenz des ETn-LTR, hier sind 197 nt an das Fragment des *Clc-1*-Transkripts angefügt. Ein entsprechendes Mutantentranskript (Spleißvariante 6) konnte in *Pdn*-Mäusen aber nicht detektiert werden, dagegen wurden die Spleißvarianten 3 und 4 auch unter den *Gli3^{Pdn}*-Transkripten gefunden.

Alle drei für das *Clc-1*-Gen in ADR-Mäusen beschriebenen Spleißvarianten führen zu stark verkürzten Fusionstranskripten. Während die *Clc-1*-Wildtyp-mRNAs eine Länge von ca. 4,5 kb aufweisen, liegt die Größe der hybriden Transkripte zwischen 1,6 und 2 kb. Sie sind damit unzureichend, um für einen funktionalen Chlorid-Kanal zu kodieren. Zudem befindet sich im Leseraster aller drei Spleißvarianten ein Stop-Codon, so daß sich jeweils ein stark verkürztes Protein ergibt.

Die von den hybriden *Clc-1*/ETn-Transkripten (cDNA1 und 2) abgeleiteten Proteindaten stimmen mit denen der Spleißvarianten 3 und 4 überein, die auch in *Pdn*-Mäusen nachgewiesen wurden. In beiden Mutantentranskripten befindet sich im Leseraster ein Stop-Codon, so daß sich für die *Gli3^{Pdn}*-Spleißvariante 3 ein auf 198 Aminosäuren und für die Spleißvariante 4 ein auf 247 Aminosäuren verkürztes Protein ergeben sollte.

Die Spleißvariante 5 ist bereits zweimal als Resultat der Integration eines ETn in ein murines Immunglobulin (Ig) beschrieben worden. Dabei ist für das γ 1-Gen im Plasmazytom P3.26Bu4 ein Intron als Integrationsort ermittelt worden (Shell et al., 1987), für das λ 2-Gen in der Hybridoma-Zelllinie P3X63Ag8 (Weiss et al., 1989) liegen dazu keine Angaben vor.

In beiden Fällen wurde in den hybriden Transkripten 425 nt ETn-Sequenz gefunden, wovon die am 3'-Ende gelegenen 168 nt auch in den Spleißvarianten 1-4 vorkommen. Dabei sind aber weder für Ig γ 1 noch für Ig λ 2 Werte bezüglich der Expressionstärke und den von den Mutantentranskripten kodierten Proteinen publiziert worden. In P3.26Bu4-Zellen wird aber noch Wildtyp-Ig γ 1-Protein produziert (Shell et al., 1987), so daß auch die entsprechende RNA vorhanden sein muß.

In der Spleißvariante 5 von *Gli3^{Pdn}* befindet sich im *Gli3*-Leseraster direkt am 5'-Ende der ETn-Sequenz ein Stop-Codon. Damit kodiert auch dieses hybride Transkript, wie bei den Spleißvarianten 3 und 4, für ein verkürztes Protein. Im Gegensatz zur Wildtyp-*Gli3*-RNA, die für ein Protein von 1582 Aminosäuren kodiert, ist die von der *Gli3^{Pdn}*-Spleißvariante 5 abgeleitete Sequenz lediglich 123 Aminosäuren lang.

Die Spleißvariante 6 wurde auch in einer embryonalen Karzinoma-Zelllinie gefunden (Pratt et al., 1990). Dort resultiert sie aus der Integration eines ETn in das Intron 6 des

Retinsäure-Rezeptor α -Gens (RAR α). Das in der Folge entstehende hybride Transkript enthält wieder die bekannten 197 nt aus dem ETn-LTR. Es kodiert für ein um 70 Aminosäuren verkürztes Protein (391 statt 461 Aminosäuren in der Wildtyp-Form), da in der ETn-Sequenz ein Stop-Codon enthalten ist. Das als RAR α' bezeichnete Protein ist ein dominanter Suppressor von Retinsäure-induzierter Transkription, da es nicht zur Bindung von Retinsäure fähig ist.

Wie bereits angeführt, konnte eine korrespondierende Spleißvariante 6 in *Pdn*-Mäusen nicht detektiert werden.

Schließlich wurden zwei weitere Mausmutanten beschrieben, die aus der Integration eines ETn resultieren. Bei beiden sind aber keine Daten zu den ETn-Sequenzen der entstehenden hybriden Transkripte veröffentlicht worden, so daß nicht geklärt werden kann, ob sie zu den bekannten Spleißvarianten zählen oder einen neuen Typ darstellen.

Die rezessive *ob^{2J}*-Mutation ("obese") in Mäusen resultiert aus der Integration eines ETn in das Intron 1 des *ob*-Gens (Moon und Friedman, 1997), daß für das Protein Leptin kodiert. Als Folge der Integration werden keine Wildtyp-RNAs mehr produziert, die Struktur der Mutantentranskripte ist aber nicht veröffentlicht worden.

Dies gilt ebenso für die murine *T^{Wis}*-Mutante, bei der ein ETn in ein Intron des *T*-Gens (*Brachyury*) integriert wurde (Herrmann et al., 1990). Hier wird als Folge eine Veränderung der *T^{Wis}*-RNA angegeben, die zu einem nicht-funktionalen Protein führt. Die Struktur der hybriden Transkripte ist aber ebenfalls nicht beschrieben.

Spleißvarianten von *Gli3^{Pdn}*

Insgesamt sind in der vorliegenden Arbeit sechs verschiedene Transkripte von *Gli3^{Pdn}* ermittelt worden: die Wildtyp-RNA und die hier als Spleißvarianten 1-5 bezeichneten hybriden *Gli3*/ETn-Transkripte. Nur eine der Spleißvarianten (Nr. 6), die bisher publiziert wurden, konnte in *Pdn*-Mäusen nicht detektiert werden.

Damit scheint die *Pdn*-Mutante eine gewisse Sonderstellung einzunehmen, da bei keiner der bisher beschriebenen ETn-Integrationen eine solche Anzahl von resultierenden hybriden Transkripten festgestellt wurde. Für MRL-*lpr*-Mäuse wurden zwei *Fas*-Mutantentranskripte beschrieben (Spleißvarianten 1 und 2), bei ADR-Mäusen wurden drei verschiedene *Clc-1*/ETn-Hybridtranskripte veröffentlicht (Spleißvarianten 3, 4, 6). Für die vier anderen ETn-Insertionsmutanten, bei denen Aussagen über die entstehenden Transkripte gemacht wurden, ist jeweils nur eine Spleißvariante gezeigt worden (p53: Spleißvariante 2; Ig γ 1 und Ig λ 2: Spleißvariante 5; RAR α : Spleißvariante 6).

Andererseits kann aber auch vermutet werden, daß bei diesen Mutanten keine detaillierteren Untersuchungen durchgeführt wurden. Dies dürfte zumindest auf diejenigen zutreffen, für die nur je ein hybrides Transkript beschrieben wurde. Die Integration eines

ETn, daß in seiner Sequenz einige Spleißstellen, Polyadenylierungssignale etc. besitzt, resultiert sehr wahrscheinlich in jeweils mehreren unterschiedlichen hybriden Transkripten.

Daher ist es auch möglich, das noch mehr als die sechs bislang bekannten Spleißvarianten nach Integration eines ETn entstehen. Für *Gli3^{Pdn}* deuten die bisherigen Daten jedoch nicht auf weitere hybride Transkripte hin, da bei den durchgeführten PCR-Analysen keine zusätzlichen spezifischen Banden auftraten.

Expression von *Gli3^{Pdn}*

Der Versuch, die hybriden *Gli3^{Pdn}*-Transkripte in einer Northern Blot-Analyse nachzuweisen, führte nicht zum Erfolg. Für die Spleißvarianten 1, 2 und 5 kann das darauf zurückgeführt werden, daß diese aufgrund ihrer geringen Größenunterschiede von den Wildtyp-Transkripten (ca. 9 kb) nicht unterschieden werden können. Insgesamt muß berücksichtigt werden, daß das *Gli3*-Gen außer im Gehirn vergleichsweise schwach exprimiert wird. Daher ist bereits für die Detektion der Wildtyp-Transkripte in einer Northern Blot-Analyse eine längere Expositionszeit nötig. Da die gegenüber der Wildtyp-RNA verkürzten Spleißvarianten 3 und 4 wiederum nur jeweils einen Teil der *Gli3^{Pdn}*-Expression ausmachen, liegen sie möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze dieser Analyse-Methode.

Aus diesem Grund wurde die RNase-Protektionsanalyse angewendet, die ebenfalls quantitative Aussagen erlaubt und eine höhere Sensitivität besitzt.

Durch diese Methode konnte dann ermittelt werden, daß in homozygoten *Pdn*-Tieren nur noch ca. 15% der *Gli3^{Pdn}*-Transkripte die Wildtyp-Form besitzen. Das hat zur Folge, daß weniger als 1/6 der RNA, die von *Gli3^{Pdn}* erstellt wird, für ein Wildtyp-Gli3-Protein kodiert, der Großteil der Transkripte ist hingegen mutiert und führt zu veränderten Proteinen, die sehr wahrscheinlich nicht funktionell sind (s.u.). Bei heterozygoten *Pdn*-Mäusen beträgt der Anteil von hybriden und Wildtyp-Transkripten hingegen jeweils ca. 50%.

Die Ähnlichkeit der Phänotypen von homozygoten *Pdn*- und *Xt*-Mäusen (s. 1.2.) findet damit auf der Ebene der Expression eine sehr gute Korrelation. Die *Xt*-Allele (*Xt^H*, *Xt^L*) sind aufgrund von Deletionen im *Gli3*-Gen Nullmutationen, so daß die Expression in heterozygoten *Xt*-Tieren auf 50% reduziert ist und in homozygoten *Xt*-Mäusen keine Wildtyp-*Gli3*-RNA entstehen kann (s. Abb. 1.2.1). Bei *Pdn/Pdn*-Mäusen werden zwar noch ca. 15% Wildtyp-*Gli3*-Transkripte synthetisiert, dies reicht aber offensichtlich nicht aus, um den Phänotyp gegenüber einer *Gli3*-Nullmutation (*Xt/Xt*) abzuschwächen, sondern führt nur zu geringen phänotypischen Differenzen.

Die Menge an funktionellem Protein liegt hier also höchstwahrscheinlich nicht über dem Anteil von 15%, die die Wildtyp-RNA an der *Gli3^{Pdn}*-Expression ausmacht. Dieser Befund

unterstützt die Annahme, daß die mutierten Proteine, die von den *Gli3^{Pdn}*-Spleißvarianten 1-5 erstellt werden, keine Funktionalität besitzen (s.u.).

Die Verhältnisse zwischen mutierten und Wildtyp-Transkripten in hetero- und homozygoten *Pdn*-Mäusen konnten durch die Untersuchung der *Gli3^{Pdn}*-Expression in Kopf und Rumpf von Wildtyp-, *Pdn/+*- und *Pdn/Pdn*-Embryonen bestätigt werden. Hierbei erwiesen sich die jeweiligen Anteile an der Expression als nahezu identisch mit denen aus der Analyse von gesamten Embryonen.

In den drei Genotypen wurden aber auch zwischen den untersuchten Strukturen keine Expressionsunterschiede festgestellt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß das Verhältnis von Wildtyp-RNA zu Mutantentranskripten innerhalb eines Tieres nicht variiert.

Mit diesen Daten ist die vorliegende Arbeit die erste Untersuchung, bei der die Folgen der Wirtsgen-Expression nach der Integration eines ETn in größerem Umfang analysiert wurden.

Bei anderen ETn-Insertionsmutanten sind zwar z.T. ebenfalls mehrere Spleißvarianten und eine Reduktion in der Menge der Wildtyp-RNA beschrieben worden, eine umfassende Analyse der mutierten Transkripte, der Gesamtexpression vom mutierten Wirtsgen und dem Anteil der Mutantentranskripte ist aber bisher nicht veröffentlicht.

Funktionalität der *Gli3^{Pdn}*-Proteine

Wichtige Anhaltspunkte für eine Abschätzung der Funktionalität der aus den Spleißvarianten resultierenden Proteinen konnten bereits durch die Translation in die jeweilige Aminosäuresequenz (s. Abb. 3.7.14) und eine Analyse der Sekundärstruktur bei den Proteinen der Spleißvarianten 1 und 2 (s. Abb. 3.7.15) gewonnen werden.

Die möglichen Proteine der Spleißvarianten 3, 4 und 5 sind gegenüber dem Wildtyp-Gli3-Protein stark verkürzt (198, 247 bzw. 123 statt 1582 Aminosäuren) und enthalten weniger als 1/12 dessen Sequenz (122 Aminosäuren des Gli3-N-Terminus). Für alle drei Proteine läßt sich daher bereits nach Ableitung der Aminosäuresequenz mit großer Sicherheit feststellen, daß sie keine Gli3-spezifische Aktivität besitzen werden.

Bei den Spleißvarianten 1 und 2 führt die Insertion der ETn-Sequenz nicht zum vorzeitigen Protein-Abbruch, sondern bei diesen werden 56 bzw. 61 Aminosäuren zwischen Pos. 122 und 123 eingefügt. Der Effekt auf die Sekundärstruktur der resultierenden Proteine geht aber weit über die direkt betroffene Region hinaus. Wertet man die Sequenzen nach dem Algorithmus von Chou & Fasman aus (s. 3.7.), dann entstehen in den jeweils eingefügten Bereichen zwei zusätzliche α -Helices, außerdem werden jeweils die aminoterminalen Regionen zwischen Aminosäure 122 und ca. 325 in ihrer Sekundärstruktur verändert. Bei

beiden mutierten Proteinen wird sich dies sehr wahrscheinlich auch auf die Tertiärstruktur auswirken und zu Proteinen führen, die in ihrer Funktionalität zumindest beeinträchtigt sind, eventuell aber auch keine Gli3-spezifischen Funktionen mehr ausführen können. Diese Annahme wird bekräftigt durch die starke Konservierung der aminoterminalen Region (s. 4.1.), die in den mutierten Proteinen unterbrochen ist.

Zusammen mit den Analysen der RNA-Expression und der Korrelation jener Daten mit den Phänotypen von *Pdn*- und *Xt*-Tieren (s.o.) kann davon ausgegangen werden, daß die Aktivität der *Gli3^{Pdn}*-Proteine nur einen Bruchteil der Aktivität des Wildtyp-Gli3 ausmacht. Die Menge an Wildtyp-Gli3-Protein und die Funktionalität der Proteine der Spleißvarianten in *Pdn/Pdn*-Mäusen reicht nicht aus, um diese von *Xt/Xt*-Tieren wesentlich abzuheben. Die Menge an funktionellem Protein in homozygoten *Pdn*-Mäusen entspricht somit offenbar nahezu der Menge in homozygoten *Xt*-Tieren, die *Gli3*-Mutation in *Pdn* damit faktisch der Nullmutation in *Xt*.

Es erweist sich in diesem Zusammenhang allerdings erneut als großer Nachteil, daß kein Antikörper gegen das murine Gli3-Protein vorhanden ist. Damit könnte nicht nur die Proteinexpression in *Pdn*-Tieren und den anderen *Gli3*-Mausmutanten ermittelt, sondern auch Größe, Struktur und Funktionalität der *Gli3^{Pdn}*-Proteine detailliert untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch versucht, mittels Fusionsproteinen und synthetischen Peptiden Antiseren gegen Gli3 zu erzeugen. Die Seren der entsprechenden immunsierten Kaninchen zeigten allerdings keinerlei Gli3-spezifische Reaktionen. Auch ein für das humane GLI3 spezifischer Antikörper der Firma Santa Cruz, der nach Aussage des Unternehmens auch das murine Gli3 detektiert, erwies sich als nicht-funktionell.

***Gli3^{Pdn}*-Proteine und humane *GLI3*-Mutationen**

Neben dem *Greig Cephalopolysyndactyly Syndrom* (GCPS; s. 1.2.) sind in letzter Zeit zwei weitere humane *GLI3*-Mutationen beschrieben worden: *Pallister-Hall Syndrom* (PHS; Kang et al., 1997) und *Postaxial Polydactyly-Typ A* (PAP-A; Radhakrishna et al., 1997). Die Eigenschaften von GCPS, PHS und PAP-A sind überlappend, aber distinkt. Menschen mit PAP-A besitzen eine postaxiale Polydaktylie, während es beim PHS zu einer zentralen und beim GCPS zu einer preaxialen Polysyndaktylie kommt. Überdies treten bei GCPS cranofaciale Fehlbildungen und bei PHS hypothalamische Hamartome und eine Reihe von viszeralen Anomalien auf.

Alle drei Erkrankungen resultieren aus Mutationen im *GLI3*-Gen, die zu verkürzten Proteinen führen. GCPS wird durch einen Translationsabbruch vor bzw. in der Zink-Finger-Region verursacht, PHS durch einen Stop der Translation kurz hinter der Zink-Finger-Domäne (ca. Aminosäure 700) und bei PAP-A endet das mutierte *GLI3*-Protein ca. bei Aminosäure 800 (Wildtyp *GLI3*: 1596 Aminosäuren).

In einem kürzlich publizierten Übersichtsartikel (Biesecker, 1997) werden diese drei Mutanten genutzt, um Schlüsse über die funktionellen Domänen des GLI3-Proteins zu ziehen, wie diese in neueren Studien des *Drosophila* GLI-homologen Cubitus interruptus (Ci) beschrieben sind (Aza-Blanc et al., 1997; Robbins et al., 1997; Ruiz i Altaba, 1997; Sisson et al., 1997). Dabei konnte gezeigt werden, daß Ci im Cytoplasma in einem Komplex mit Costal2 und Fused an das Mikrotubuli-System gebunden ist. Wird Ci durch eine Hedgehog-regulierte Protease zwischen der Zink-Finger- und der Mikrotubuli-Bindungsdomäne gespalten, migriert das aminoternale Fragment in den Nucleus, wo es als Repressor von *hedgehog*, *patched* und *decapentaplegic* wirkt. Das intakte Ci voller Länge kann ebenfalls in den Zellkern gelangen, agiert dort aber als transkriptioneller Aktivator. Hedgehog scheint damit seine Zielgene durch das Verhältnis von Ci-Repressor- zu Aktivator-Form zu modulieren.

Biesecker entwirft nun ein Modell, bei dem die Repressor- und Aktivator-Funktionen von Ci in Vertebraten nicht, wie bisher angenommen, auf die drei Gli-Proteine aufgeteilt sind (s. 1.3.), sondern ebenfalls durch verschiedene Formen eines Proteins ausgeführt werden. Sie postuliert, daß GLI3 in voller Länge aktivierend wirkt, während nach proteolytischer Spaltung carboxy-terminal der Zink-Finger-Region der aminoternale Teil einen reprimierenden Transkriptionsfaktor darstellt.

Nach dieser Vorstellung wären die drei Domänen (Zink-Finger, proteolytischer Spaltungsbereich, Mikrotubuli-Bindung) sequentiell in den drei aufgeführten humanen GLI3-Mutanten betroffen. In PHS liegt die Mutation zwischen der Zink-Finger- und der Mikrotubuli-Bindungsdomäne, das resultierende Protein wäre daher vergleichbar mit dem aminoternalen Teil von Ci. Es sollte somit zur DNA-, nicht aber zur Mikrotubuli-Bindung fähig sein und wäre dadurch ein konstitutiver Repressor. Das PAP-A GLI3-Protein würde demnach noch alle drei Domänen besitzen, wohingegen dem mutierten Protein in GCPS auch die DNA-Bindungsfähigkeit fehlt, was in der Folge zur Haploinsuffizienz führt.

Aus dieser Hypothese leitet sie ab, daß Mutationen im GLI3-Gen, die weiter 5' als die GCPS-Mutation liegen, zu einem Phänotyp führen, der von GCPS nicht zu unterscheiden ist. Mutierte GLI3-Proteine, die zwischen der Zink-Finger-Region und der Mikrotubuli-Bindungsdomäne enden, sollten demnach zu einem PHS-Phänotyp führen. Proteinabbrüche C-terminal von der PAP-A-Mutation könnten dann, sofern sie eine intakte Mikrotubuli-Bindungsdomäne enthalten, abrupt oder graduell in einen normalen Phänotyp übergehen.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter diesen Gesichtspunkten, so passen sie zu der von Biesecker aufgestellten Hypothese. In *Gli3^{Pdn}* liegt eine Mutation im 5'-Bereich der kodierenden Region vor, die bei drei der sechs resultierenden Proteine zu

einem Abbruch in der aminoterminalen Hälfte und bei zwei weiteren zu starken Strukturveränderungen im gleichen Bereich führen. Nach dem oben beschriebenen Modell müßte dies dazu führen, daß in den Proteinen die drei funktionellen Domänen fehlen bzw. inaktiv sind, als Folge sollte ein GCPS-analoger Phänotyp entstehen. Wie in 1.2. aufgeführt wird die *Xt*-Mutante als Mausmodell des humanen GCPS angesehen und tatsächlich stimmen die phänotypischen Merkmale von homozygoten *Pdn*- und *Xt*-Mäusen überein.

Demzufolge stehen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse im Einklang mit dem Biesecker-Modell einer durch proteolytischen Spaltung von *GLI3* modulierten Transkriptionsregulation. Weitere Daten aus *Drosophila*-Mutanten, Mausmodellen und humanen Syndromen sind aber nötig um zu klären, welches der beiden Modelle den tatsächlichen Verhältnissen näher kommt und damit ein eindeutigeres Bild der *GLI3*-Funktionsweise zu entwerfen.

4.3. EXPRESSIVITÄT DES HETROZYGOTEN PHÄNOTYPS UND *Gli3*-EXPRESSION IN *Pdn*-MÄUSEN

Die niedrige Expressivität des *Pdn*/+-Phänotyps, die bei Kreuzungen von Wildtyp- mit heterozygoten *Pdn*-Mäusen beobachtet wurde, ist in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, daß tatsächlich ca. 50% der Nachkommen genotypisch heterozygot sind, obwohl nur ca. 25% den heterozygoten Gliedmaßen-Phänotyp zeigen.

Durch die nachfolgende Analyse wurde dann festgestellt, daß zwischen adulten heterozygoten *Pdn*-Mäusen starke Abweichungen in der Menge an mutierten Transkripten bestehen, die jeweils von *Gli3*^{*Pdn*} synthetisiert werden. *Pdn*/+-Tiere ohne Phänotyp zeigen eine Menge an Mutantentranskripten, die mit der der Wildtyp-Transkripte ungefähr übereinstimmt, es ergibt sich also ein Verhältnis von ca. 1:1. Während die Menge an Wildtyp-*Gli3*-RNA auch in heterozygoten Tieren mit Phänotyp nahezu unverändert ist, werden in diesen aber dreimal mehr hybride Transkripte erstellt, hier liegt das Verhältnis also ca. bei 1:3 (s. Abb. 3.8.2).

Weil sowohl weibliche als auch männliche Tiere mit und ohne Phänotyp untersucht wurden und die Ergebnisse für beide Geschlechter gleich waren, konnten geschlechtsspezifische Unterschiede als Ursache ausgeschlossen werden. Auch organspezifische Expressionsunterschiede zwischen den Anteilen von Wildtyp- und Mutantentranskripten wurden nicht detektiert, die bereits bekannten Differenzen in der Stärke der *Gli3*-Expression zwischen verschiedenen Organen (Schimmang et al., 1992) konnten hingegen bestätigt werden.

Da die Menge an Wildtyp-*Gli3*-RNA in *Pdn*/+-Tieren mit und ohne Phänotyp fast identisch ist, kann davon ausgegangen werden, daß dies auch für die Konzentration des Wildtyp-*Gli3*-Proteins gilt. Der Phänotyp, der bei heterozygoten Tieren mit einer starken Expression von Mutantentranskripten auftritt, scheint demnach das Resultat eines Überschusses an *Gli3*^{*Pdn*}-Proteinen zu sein. Übersteigt die Menge an mutierten Transkripten nicht die der Wildtyp-RNA, bleiben heterozygote *Pdn*-Mäuse phänotypisch unauffällig. Eine deutliche Erhöhung der Menge an Mutantentranskripten führt dann aber zu den beschriebenen phänotypischen Veränderungen (s. 1.2.).

Folgt man dieser Hypothese weiter, dann könnte der drastische Überschuss an mutierten Proteinen bei *Pdn/Pdn*-Tieren, der aus der dort vorhandenen Menge an Mutantentranskripten (s. Abb. 3.7.18) abgeleitet werden kann, für den homozygoten Phänotyp verantwortlich sein, bei dem es nicht nur zu einer verstärkten Beeinträchtigung der Gliedmaßenentwicklung, sondern auch zu Fehlbildungen des Gehirns kommt.

Die phänotypische Merkmalsausprägung bei *Pdn*-Mäusen korreliert mit dem Verhältnis von Wildtyp- zu Mutantentranskripten: bei einer Relation von ca. 1:1 bleiben *Pdn*/+-Tiere phänotypisch ununterscheidbar von +/+Tieren, steigt das Verhältnis auf ca. 1:3, so wird der milde heterozygote Phänotyp sichtbar. Schon bei einer Relation von ca. 1:5, die bei homozygoten Tieren mindestens erreicht wird (s. Abb. 3.7.19), kommt es dann aber zu extremen phänotypischen Veränderungen (der *Pdn/Pdn*-Embryo, dessen RNA für die in Abb. 3.7.19 dargestellte Analyse eingesetzt wurde, wies eine Exenzephalie auf).

Die Stärke der Expression von hybriden *Gli3*^{*Pdn*}-Transkripten steht also offenbar in direktem Zusammenhang mit der Intensität des Phänotyps bei *Pdn*-Mäusen.

Als Erklärung hierfür ist vorstellbar, daß die Proteine, die von den mutierten Transkripten kodiert werden, durch eine mögliche Restaktivität einen inhibierenden Einfluß ausüben (z.B. Proteine der Spleißvarianten 1 und 2, indem sie zwar noch zur DNA-Bindung, aber nicht mehr zur Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren in der Lage sind). Ohne einen *Gli3*-spezifischen Antikörper läßt sich dies allerdings nicht weiter aufklären, da die jeweiligen Anteile und abweichenden Funktionsweisen der mutierten Proteine nicht analysiert werden können. Mit dieser Hypothese läßt sich auch wieder die Diskrepanz zum Biesecker-Modell erklären, da bei diesem nur von verkürzten Proteinen mit "definierten" Funktionsverlusten ausgegangen wird (s. 4.2.).

Für heterozygote *Pdn*-Tiere muß dabei erörtert werden, wie es zu einer so verschiedenen Expression von Mutantentranskripten zwischen unterschiedlichen Tieren kommt. Eine mögliche Erklärung wird durch die Struktur des ETn geliefert, das bei der *Pdn*-Mutante in das *Gli3*-Gen integriert ist. Wie bereits beschrieben sind in der Sequenz des ETn neben Spleißstellen und Polyadenylierungssignalen auch Promotoren und transkriptionelle

Enhancer enthalten (s. 4.2.). Diese üben möglicherweise einen differentiellen Einfluß auf die Expression von hybriden Wirtsgen/ETn-Transkripten aus.

Zudem wurden bereits eine Reihe von Faktoren beschrieben, die für die Modulation der Transkription von Retrotransposons in Frage kommen. Entsprechende Effekte wurden für EGF ("*Epidermal Growth Factor*", Foster et al., 1982), die Onkogene *myc* und *E1A* (Luria und Horowitz, 1986), Protein-Kinase C (Rodland et al., 1986) und cyclisches AMP (Harrigan et al., 1989) gezeigt. Auch die Methylierung von Retrotransposon-Sequenzen wurde mit ihrer transkriptionellen Regulation in Zusammenhang gebracht (Morgan und Hwang, 1984; Carter et al., 1986). Obendrein wird eine Beeinflussung von Retrotransposons durch Hormone diskutiert. So wurden Hormon-induzierbare Enhancer und "*hormone response elements*" in unterschiedlichen Retrotransposon-Familien detektiert (Stavenhagen und Robbins, 1988; Beato, 1989).

Andererseits ist aber auch eine Auswirkung der Integration von ETn-Sequenz auf die Stabilität der resultierenden hybriden RNA denkbar. Hier spielen möglicherweise RNA-bindende Proteine eine Rolle, die ETn-Sequenzen erkennen. Eine Stabilisierung bzw. Degradation der mutierten RNAs könnte demnach von der Expression und Konzentration dieser Proteine in unterschiedlichen *Pdn*/+-Tieren abhängen.

Als Ursprung der unterschiedlichen Expressionsstärke von Mutantentranskripten in heterozygoten *Pdn*-Mäusen kommen daher zahlreiche Möglichkeiten in Frage, deren Untersuchung einen aufschlußreichen Eindruck von der komplexen Regulation der ETn-Transkription und dessen Konsequenzen liefern werden.

4.4. LOKALISATION DER ETn-INTEGRATION IN *Gli3*^{P^{DN}}

Der Integrationsort des ETn ist bei allen bisher beschriebenen Mutanten ein Intron des jeweiligen Wirtsgens. Trotzdem findet sich in den resultierenden hybriden Transkripten nur bei der Hälfte der betroffenen Gene eine vollständige Konsensus-Spleißdonor- bzw. akzeptorsequenz am Übergang von Wirts- zu ETn-RNA.

Daß auch in den *Gli3*^{P^{dn}}-Transkripten die tatsächlichen Spleißstellen von den Konsensussequenzen abweichen, steht daher dem Schluß nicht entgegen, daß auch in der *Pdn*-Mutante die Integration des ETn in einem Intron erfolgt ist.

Auf ein sehr großes Intron als Integrationsort deuten auch die Ergebnisse der Southern Blot-Analysen nach Pulsfeld-Gelelektrophoresen zur Auftrennung großer DNA-Fragmente hin. Dieser Befund wird durch die PCR-Analysen mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial bestärkt, bei denen mit keiner Primerkombination ein spezifisches Produkt erhalten werden konnte.

Hätte die Integration des ETn bei der *Pdn*-Mutante in einem *Gli3*-Exon stattgefunden, so wäre das Auftreten von Wildtyp-Transkripten in *Pdn/Pdn*-Tieren unwahrscheinlich, da durch diese Strukturveränderung das Spleißing zu einer "normalen" mRNA sehr fraglich ist. Daß in homozygoten *Pdn*-Mäusen aber immer noch ca. 15% *Gli3*-Wildtyp-RNA detektiert werden, weist somit wiederum auf ein Intron als ETn-Integrationsort hin, auch wenn endgültige genomische Daten für *Gli3*^{*Pdn*} noch ausstehen.

4.5. AUSBLICK

Auch nach den neuen Erkenntnissen, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden konnten, bleiben die *Gli3*-Mutanten und im speziellen die *Pdn*-Mutante interessante Objekte für weitere Untersuchungen.

Mehrere Aspekte konnten noch nicht vollständig aufgeklärt werden, so daß zu diesen weitere Analysen durchgeführt werden sollten. Als Hauptpunkt ist hier die Auswirkung der ETn-Integration auf die *Gli3^{Pdn}*-Proteine anzusehen. Für die Untersuchung der *Gli3*-Proteinmengen, die in Wildtyp- und *Pdn*-Mäusen produziert werden, ist ein *Gli3*-spezifischer Antikörper unerlässlich. Die Produktion eines solchen bleibt in jedem Fall ein wichtiges Ziel. Die Funktionalität der Mutantenproteine läßt sich allerdings auch durch andere Studien testen. Grundlage hierfür sind die Untersuchungen, die mit einem Reporter-gen-Konstrukt durchgeführt wurden, das in seinem Promoter acht *Gli*-Bindungsstellen besitzt (Sasaki et al., 1997). Das humane *GLI1* konnte bei Kotransfektion die Luciferase-Expression aktivieren, dieser Effekt wurde bei zusätzlicher Einbringung von *GLI3* aufgehoben. Die Hypothesen, das *GLI1* als transkriptioneller Aktivator und *GLI3* als Repressor wirkt sowie das die *GLI*-Proteine gemeinsame Bindungssequenzen besitzen, wurde somit unterstützt. Auch das murine *Gli3*-Protein führte in ersten Experimenten zu obigem Resultat (D. Büscher, unveröffentlicht). Entsprechende Analysen mit den *Gli3^{Pdn}*-Proteinen könnten somit Aufschluß darüber geben, ob eines der Mutantenproteine noch eine Aktivität besitzt.

Auch die differentielle Regulation von *Gli3^{Pdn}* in heterozygoten *Pdn*-Mäusen, auf der sehr wahrscheinlich die niedrige Transmission des Phänotyps bei *+/+ x Pdn/+*-Kreuzungen beruht, stellt einen interessanten Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen dar. Z.B. könnte hier ein Luciferase-Vektor genutzt werden, um Teile der ETn-Sequenz in diesen zu klonieren und den Effekt auf die Expression des Reportergens zu analysieren.

Weiterhin steht noch ein eindeutiger Nachweis der ETn-Integration auf genomischer Ebene aus, wobei auch eine detailliertere Aufklärung der genomischen Organisation des *Gli3*-Gens wünschenswert ist. Von Bedeutung ist schließlich auch die Detektion und Analyse des *Gli3*-Promoters, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls begonnen wurde.

Die Beantwortung der aufgeführten Fragestellungen wird weitere Einblicke in die Gliedmaßenentwicklung, die Funktionsweise von *Gli3* und dessen Situation in *Pdn*-Mäusen ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- ADACHI, M., R. WATANABE-FUKUNAGA, S. NAGATA (1993): Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen of *lpr* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1756-1760.
- AKIMARU H, Y. CHEN, P. DAI, D.X. HOU, M. NONAKA, S. SMOLIK, S. ARMSTRONG, R. GOODMAN, S. ISHII (1997): *Drosophila* CBP is a co-activator of *cubitus interruptus* in hedgehog signalling. *Nature* 386, 735-738.
- AZA-BLANC P., F. RAMIREZ-WEBER, M. LAGET, C. SCHWARTZ, T. KORNBERG (1997): Proteolysis that is inhibited by Hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-1053.
- BEATO, M. (1989): Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344.
- BEDELL, M. A., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G. (1997a): Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes & Development* 11, 1-10.
- BEDELL, M. A., LARGAESPADA, D. A., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G. (1997b): Mouse models of human disease. Part II: Recent progress and future directions. *Genes & Development* 11, 1-10.
- BIESECKER, L. (1997): Strike three for *GLI3*. *Nature Genetics* 17, 259-260.
- BLOMBERG, J., NIVED, O., PIPKORN, R., BENGTTSSON A., ERLINGE D., STURFELT, G. (1994): Increased antiretroviral antibody reactivity in sera from a defined population of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheum.* 37, 57-66.
- BOEKE, J., GARFINKEL, D., STYLES, C., FINK, G. (1985): Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell* 40, 491-500.
- BRULET P., M. KAGHAD, Y. XU, O. CROISSANT, F. JACOB (1983): Early differential tissue expression of transposon-like repetitive sequences of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5641-5645.

- BRULET P., H. CONDAMINE, F. JACOB (1985): Spatial distribution of transcripts of the long repeated ETn sequence during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2054-2058.
- BÜSCHER D., B. BOSSE, J. HEYMER, U. RÜTHER (1997a): Evidence for genetic control of *Sonic hedgehog* by *Gli3* in mouse limb development. *Mech. Dev.* 62, 175-182.
- BÜSCHER, D., U. RÜTHER (1997b): Expression profile of *Gli* family members and *Shh* in normal and mutant mouse limb development. *Dev. Dyn.*, in press.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7, 1513.
- BROWN, R., C. SANDER, P. ARGOS (1985): The primary structure of transcription factor TFIID has 12 consensus repeats. *FEBS Lett.* 186, 271-274.
- CAPECCHI M.R. (1989a): Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-1292.
- CAPECCHI M.R. (1989b): The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5, 70-76.
- CARTER, A., NORTON, J., GIBSON, Y., AVERY, A. (1986): Expression and transmission of a rodent retrovirus-like (VL30) gene family. *J. Mol. Biol.* 188, 105-108.
- CHOU, P., FASMAN, G. (1978): Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47, 45-148.
- CHU, J., J. DRAPPA, A. PARNASSA, K. ELKON (1993): The defect in *Fas* mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon, Etn. *J. Exp. Med.* 178, 723-730.
- CHURCH, G.M., GILBERT, W. (1984): Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991.

- CLARK, J.M. (1988): Novel non-Templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* 14, 9677
- CROSSLEY, P., G. MINOWADA, C. MACARTHUR, G. MARTIN (1996): Roles for *FGF8* in the Induction, Initiation and Maintenance of Chick Limb development. *Cell* 84, 127-136.
- DIETRICH, W. F., MILLER, J., STEEN, R., MERCHANT, M. A., DAMRON-BOLES, D., HUSAIN, Z., DREDGE, R., DALY, M. J., INGALLS, K. A., O'CONNOR, T. J., EVANS, C. A., DEANGELIS, M. M., LEVINSON, D. M., KRUGLYAK, L., GOODMAN, N., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., HAWKINS, T. L., STEIN, L., PAGE, D. C., LANDER, E. S. (1996): A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 380, 149-152.
- DOOLITTLE, D. P., DAVISSON, M. T., GUIDI, J. N., GREEN, M. C. (1996): Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In: *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*. Herausgeber M. F. Lyon, S. Rastan und S. D. M. Brown, Oxford University Press, Oxford, UK, 17-854.
- DUBOULE, D. (1994): How to make a limb? *Science* 266, 575-576.
- FAVOR, J., MORAWETZ, C. (1992): Insertional mutations in mammals and mammalian cells. *Mut. Res.* 184, 53-74.
- FALLON, J. F., LOPEZ, A., ROS, M. A., SAVAGE, M. P., OLWIN, B. B., SIMANDL, B. K. (1994): FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* 264, 104-107.
- FEINBERG, A.P., VOGELSTEIN, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6.
- FEINBERG, A.P., VOGELSTEIN, B. (1984): Addendum: "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Anal. Biochem.* 137, 266.
- FIELDS, C., ADAMS, M. D., WHITE, O., VENTER, J. C. (1994): How many genes in the human genome? *Nature Genetics* 7, 345-346.
- FINNEGAN, D. (1985): Transposable elements in eukaryotes. *Int. Rev. Cytol.* 93, 281-326.

- FOSTER, D., SCHMIDT, L., HODGSON, C., MOSES, H., GETZ, M. (1982): Polyadenylylated RNA complementary to a mouse retrovirus-like multigene family is rapidly and specifically induced by epidermal growth factor stimulation of quiescent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 7317-7321.
- GANAN, Y., D. MACIAS, M. DUTERQUE-COQUILLAUD, M. ROS, J. HURLE (1996): Role of TGF- β s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* 122, 2349-2357.
- GARCIA-MARTINEZ, V., MACIAS, D., GANAN, Y., GARCIA-LOBO, J. M., FRANCA, M. V., FERNANDEZ-TERAN, M. A., HURLE, J. M. (1993): Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J. Cell Sci.* 106, 201-208.
- GARFINKEL, D., BOEKE, J., FINK, G. (1985): Ty element transposition: reverse transcriptase and virus-like particles. *Cell* 42, 507-517.
- GRAHAM, A. (1994): The Hox code out on a limb. *Curr. Biol.* 4, 1135-1137.
- GREIG, D. (1926): Oxycephaly. *Edin. med. J.* 33, 189-218.
- HAFFTER, P., GRANATO, M., BRAND, M., MULLINS, M. C., HAMMERSCHMIDT, M., KANE, D. A., ODENTHAL, J., VAN EEDEN, F. J. M., JIANG, Y.-J., HEISENBERG, C.-P., KELSH, R. N., FURUTANI-SEIKI, M., VOGELSANG, E., BEUCHLE, D., SCHACH, U., FABIAN, C., AND NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1996): The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36.
- HANAHAN, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557.
- HARRIGAN, M., BAUGHMAN, G., CAMPBELL, F., BOURGEOIS, S. (1989): Isolation and characterization of glucocorticoid- and cyclic AMP-induced genes in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3438-3446.

- HAYASAKA, I., NAKATSUKA, T., FUJII, T., NARUSE, I., ODA, S. (1980): *Polydactyly Nagoya, Pdn*: a new mutant gene in the mouse. *Exp. Anim.* 29, 391-395.
- HERRMANN, B., S. LABEL, A. POUSTKA, T. KING, H. LEHRACH (1990): Cloning of the *T* gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343, 617-622.
- HOGAN, B., BEDDINGTON, R., COSTANTINI, F., LACY, E. (1994): Manipulating the Mouse Embryo-A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- HUI, C., A. JOYNER (1993): A mouse model of GCPS: the *extra-toes^d* mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nature genetics* 3, 241-246.
- HUI, C., D. SLUSARSKI, K. PLATT, R. HOLMGREN, A. JOYNER (1994): Expression of Three Mouse Homologs of the Drosophila Segment Polarity Gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in Ectoderm- and Mesoderm-Derived tissues Suggests Multiple Roles during Postimplantation Development. *Developmental Biology* 162, 402-413.
- JANKNECHT, R., HUNTER, T. (1996): Versatile molecular glue. *Curr. Biol.* 6, 951-954.
- JIANG, R., GRIDLEY, T. (1997): Gene targeting: Things go better with Cre. *Cur. Biol.* 7, R321-323.
- JOHNSON, D. R. (1967): *Extra-toes*: a new mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 17, 543-581.
- JOYNER, A. (1993): *Gene targeting: A practical approach*. Oxford University Press Inc.
- KANG S., J. GRAHAM, A. OLNEY, L. BIESECKER (1997): GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nature Genetics* 15, 266-268.
- KAGHAD, M., L. MAILLET, P. BRULET (1985): Retroviral characteristics of the long terminal repeat of murine E.Tn sequences. *EMBO Journal* 4, 2911-2915.
- KENNELLY, P., Krebs, E. (1991): Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 266, 15555-15558.

- KESHET, E., R. SCHIFF, A. ITIN (1991): Mouse retrotransposons: a cellular reservoir of long terminal repeat (LTR) elements with diverse transcriptional specificities. *Adv. Cancer Res.* 56, 215-251.
- KESSEL, M., GRUSS, P. (1990): Murine Developmental Control Genes. *Science* 249, 374-379.
- KINZLER, K., RUPPERT, J., BIGNER, S., VOGELSTEIN B. (1988): The Gli gene is a member of the Krüppel family of zinc finger proteins. *Nature* 322, 371-374.
- KINZLER, K., VOGELSTEIN, B. (1990): The *GLI* gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell. Biol.* 10, 634-642.
- KOBAYASHI, S., T. HIRANO, M. KAKINUMA, T. UEDE (1993): Transcriptional repression and differential splicing of *Fas* mRNA by early Transposon (ETn) insertion in autoimmune *LPR* mice. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 191, 617-624.
- KÜHN, R., SCHWENK, F., AGUET, M., RAJEWSKY, W. (1995): Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
- KRUMLAUF, R. (1994): *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
- LANGLEY, K.E., VILLAREJO, M.E., FOWLER, A.V., ZAMENHOFF, P.J., ZABIN, T. (1975): Molecular basis of β -Galactosidase α complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1254.
- LAUFER, E., C. NELSON, R. JOHNSON, B. MORGAN, C. TABIN (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.
- LAUFER E., R. DAHN, O. OROZCO, C-Y. YEO, J. PISENTI, D. HENRIQUE, U. ABBOTT, J. FALLON, C. TABIN (1997): Expression of *Radical fringe* in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* 386, 366-373.
- LEE J., K. PLATT, P. CENSULLO, A. RUIZ I ALTABA (1997): Gli1 is a target of sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124, 2537-2552.

- LEHRACH, H., DRMANAC, R., HOHEISEL, J., ZOIA, L., LENNON, G., MONACO, A., NIZETIC, D., ZEHETNER, G., AND POUSTKA, A. (1990): Hybridization fingerprinting in genome mapping and sequencing. In *Genome Analysis volume 1: Genetic and physical mapping*, 39-81. Herausgeber K. Davies und S. Tilghman, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- LEIB-MÖSCH, C., BRACK-WERNER, R., WERNER, T., BACHMANN, M., FAFF, O., ERFLE, V., HEHLMANN, R. (1990): Endogenous retroviral elements in human DNA. *Cancer Res.* 50, 5636s-5642s.
- LOOMIS, C. A., HARRIS, E., MICHAUD, J., WURST, W., HANKS, M., JOYNER, A. L. (1996): The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* 382, 360-363.
- LURIA, S., HOROWITZ, M. (1986): The long terminal repeat of the intracisternal A particle as a target for transactivation by oncogene products. *J. Virol.* 57, 998-1003.
- MACIAS D., Y. GANAN, T. SAMPATH, M. PIEDRA, M. ROS, J. HURLE (1997): Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* 124, 1109-1117.
- MANDEL, M., HIGA, A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Biol. Chem.* 53, 159.
- MARIGO, V., R. JOHNSON, A. VORTKAMP, C. TABIN (1996): Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during Limb development. *Developmental Biology* 180, 273-283.
- MARINE J., E. BELLEFROID, H. PENDEVILLE, J. MARTIAL, T. PIELER (1997): A role for *Xenopus* Gli-type zinc finger proteins in the early embryonic patterning of mesoderm and neuroectoderm. *Mech. Dev.* 63, 211-225.
- MASUYA, H., T. SAGAI, S. WAKANA, K. MORIWAKI, T. SHIROISHI (1995): A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes & Development* 9, 1645-1653.
- MASUYA H., T. SAGAI, K. MORIWAKI, T. SHIROISHI (1997): Multigenic Control of the localization of the zone of polarizing activity in limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 42-51, 42-51.

- McGINNIS, W., KRUMLAUF, R. (1992): Homeobox Genes and Axial Patterning. *Cell* 68, 283-302.
- McPHERSON, M.J., QUIRKE, P., TAYLOR, G.R. (1992): *PCR – A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- MILLER, J. A. McLACHLAN, A. KLUG (1985): Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIa from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4, 1609-1614.
- MITREITER, K., J. SCHMIDT, A. LUZ, M. ATKINSON, H. HÖFLER, V. ERFLE, P. STRAUSS (1994): Disruption of the murine p53 gene by insertion of an endogenous retrovirus-like element (Etn) in a cell line from radiation-induced osteosarcoma. *Virology* 200, 837-841.
- MO, R., A. FREER, D. ZINYK, M. CRACKOWER, J. MICHAUD, H. HENG, K. CHIK, X. SHI, L. TSUI, S. CHENG, A. JOYNER, C. HUI (1997): Specific and redundant functions of *Gli2* and *Gli3* zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 124, 113-123.
- MOON, B., FRIEDMAN J. (1997): The molecular basis of the obese mutation in *ob^{2J}* mice. *Genomics* 42, 152-156.
- MORGAN, R., HWANG, R. (1984): Correlation of undermethylation of intracisternal A-particle genes with expression in murine plasmacytomas but not in NIH/3T3 embryo fibroblasts. *Cancer Res.* 44, 5234-5241.
- MURPHY, E. D., ROTHS, J. B. (1978): Autoimmunity and lymphoproliferation: Induction by mutant gene *lpr*, and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB mice. In: *Genetic Control of Autoimmune Disease*. Herausgeber Rose, Bigazzi und Warner, Elsevier North Holland, Niederlande, 207-220.
- NARUSE, I., H. KEINO (1995): Apoptosis in the developing CNS. *Progress in Neurobiology* 47, 135-155.
- NARUSE, I., K. KATO, T. ASANO, F. SUZUKI, Y. KAMEYAMA (1990): Developmental brain abnormalities accompanied with the retarded production of S-100 β protein in genetic polydactyly mice. *Developmental Brain Research* 51, 253-258.

- NISWANDER, L., TICKLE, C., VOGEL, A., BOOTH, I., MARTIN, G. R. (1993): FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 75, 579-587.
- NISWANDER, L., S. JEFFREY, G. MARTIN, C. TICKLE (1994): A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* 371, 609-612.
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C., WIESCHAUS, E. (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1994): Of flies and fishes. *Science* 266, 572-574.
- ODA, S., NARUSE, I., HAYASAKA, I., KAMEYAMA, Y. (1982): Linkage of *Pdn* (Polydactyly Nagoya) and *bg* (beige) on chromosome No. 13 in the mouse. *Ann. Res. Inst. Environ. Med., Nagoya University* 33, 284-287.
- OHUCHI H, T. NAKAGAWA, A. YAMAMOTO, A. ARAGA, T. OHATA, Y. ISHIMARU, H. YOSHIOKA, T. KUWANA, T. NOHNO, M. YAMASAKI, N. ITOH A. S. NOJI (1997): The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* 124, 2235-2244.
- ORENIC, T., SLUSARSKI, D., KROLL, K., HOLMGREN, R. (1990): Cloning and characterization of the segment polarity gene cubitus interruptus Dominant of *Drosophila*. *Genes Dev.* 4, 1053-1067
- PANGANIBAN, A., TEMIN, H. (1983): The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for integration but not virus production. *Nature* 306, 155-160.
- PAVLETICH, N., C. PABO (1993): Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* 261, 1701-1707.
- PARR B., A. McMAHON (1995): Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374, 350-353.

- PETRIJ, F., R. GILES, H. DAUWERSE, J. SARIS, R. HENNEKAM, M. MASUNO, N. TOMMERUP, G. VAN OMMEN, R. GOODMAN, D. PETERS, M. BREUNING (1995): Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376, 348-351.
- PIELER, T., BELLEFROID, E. (1994): Perspectives on zinc finger function and evolution: an update. *Mol. Biol. Rep.* 20, 1-8.
- PLATT K., J. MICHAUD, A. JOYNER (1997): Expression of the mouse *Gli* and *Ptc* genes is adjacent to embryonic sources of hedgehog signal suggesting a conservation of pathways between flies and mice. *Mech. Dev.* 62, 121-135.
- POHL, T., M.-G. MATTEI AND U. RÜTHER (1990): Evidence for allelism of the recessive insertional mutation *add* and the dominant mouse mutation *extra-toes* (*Xt*). *Development* 110, 1153-1157.
- PRATT, M., J. KRALOVA, M. McBURNEY (1990): A dominant negative mutation of the alpha retinoic acid receptor gene in a retinoic acid-nonresponsive embryonal carcinoma cell. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6445-6453.
- RADHAKRISHNA, U., WILD, A., GRZESCHIK, K., ANTONARAKIS, S. (1997): Mutation in *GLI3* in postaxial polydactyly type A. *Nature Genetics* 17, 269-271.
- RAMIREZ-SOLIS, R., LIU, P., BRADLEY, A. (1995): Chromosome engineering in mice. *Nature* 378, 720-724.
- RIDDLE, R. D., RANDY, L. J., LAUFER, E., TABIN, C. (1993): *Sonic hedgehog* mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416.
- RIDDLE, R., M. ENSINI, C. NELSON, T. TSUCHIDA, T. JESSELL, C. TABIN (1995): Induction of the LIM Homeobox Gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83, 631-640.
- RIJKERS, T., PEETZ, A., RÜTHER, U. (1994): Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic Res.* 3, 203-215.
- ROBBINS D., K. NYBAKKEN, R. KOBAYASHI, J. SISSON, J. BISHOP, P. THEROND (1997): Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the Kinesin-related protein Costal2. *Cell* 90, 225-234.

- ROBERTS, W., DOUGLASS, E., PEIPER, S., HOUGHTEN P., LOOK, A. (1989): Amplification of the Gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Res.* 49, 5407-5413.
- ROBERTSON, E. J. (1987). Embryo-derived stem cell lines. In: *Teratocarcinomas and embryonic stem cells*. Herausgeber E. J. Robertson, IRL Press, Oxford, UK, 71-112.
- RODLAND, K., JUE, S., MAGUN, B. (1986): Regulation of VL30 gene expression by activators of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 261, 5029-5033.
- RODRIGUEZ-ESTEBAN C., J. SCHWABE, J. DE LA PENA, B. FOYS, B. ESHELMAN A. J. IZPISUA-BELMONTE (1997): *Radical fringe* positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature* 386, 360-365.
- RUIZ I ALBATA, A. (1997): Catching a Gli-mipse of Hedgehog. *Cell* 90, 193-196.
- RUPPERT, J., K. KINZLER, A. WONG, S. BIGNER, M. LAW, H. SEUANEZ, S. O'BRIEN, B. VOGELSTEIN (1988): The GLI-Kruppel Family of Human Genes. *Mol. Cell. Biol.*, 3104-3113.
- RUPPERT, J., B. VOGELSTEIN, K. ARHEDEN, K. KINZLER (1990): GLI3 encodes a 190-Kilodalton Protein with Multiple Regions of GLI Similarity. *Mol. Cell. Biol.*, 5408-5415.
- SANGER, F., COULSON, A.R. (1974): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with the DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94, 441.
- SANGER, F., NIKLEN, S., COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463.
- SASAKI H., C.C. HUI, M. NAKAFUKU, H. KONDOH (1997): A binding site for Gli proteins is essential for *HNF-3 β* floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124, 1313-1322.
- SAUNDERS, J., GASSELING, M. (1957): The role of the apical ridge of ectoderm in the differentiation of the morphological structure and inductive specificity of limb parts of the chick. *J. Morphol.* 101, 57-88.

- SAUNDERS, J. W., GASSELING, M. T. (1968): Ectodermal-mesodermal interactions in the origination of limb symmetry. In: *Epithelial-mesenchymal interactions*. Herausgeber R. Fleischmajer und R. E. Billingham, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 78-97.
- SAUNDERS, J. W., REUSS, C. (1974): Inductive and axial properties of prospective wingbud mesoderm in the chick embryo. *Dev. Biol.* 38, 41-50.
- SCHIMMANG, T., M. LEMAISTRE, A. VORTKAMP, U. RÜTHER (1992): Expression of zinc finger gene *Gli3* is affected in the morphogenetic mouse mutant *extra-toes (Xt)*. *Development* 116, 799-804.
- SCHIMMANG, T., I. ODA, U. RÜTHER (1994): The mouse mutant Polydactyly Nagoya (*Pdn*) defines a novel allele of the zinc finger gene *Gli3*. *Mammalian Genome* 5, 384-386.
- SHELL, B., SZURECK, P., DUNNICK, W. (1987): Interruption of two Immunoglobulin Heavy-Chain switch regions in murine plasmacytoma P3.26Bu4 by insertion of retroviruslike element Etn. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1364-1370.
- SHELL, B., J. COLLINS L. ELENICH, P. SZUREK, W. DUNNICK (1990): Two subfamilies of murine retrotransposon ETn sequences. *Gene* 86, 269-274.
- SISSON J., K. HO, K. SUYAMA, M. SCOTT (1997): Costal2, a novel Kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 90, 235-245.
- SMITH, L.M., SANDERS, J.Z., KAISER, R.J., HUGHES, P., DODD, C., CONNELL, C.R., HEINER, C., KENT, S.B.H., HOOD, L.E. (1986): Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321, 674.
- SOUTHERN, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503.
- STAVENHAGEN, J., ROBBINS, D. (1988): An ancient provirus has imposed androgen regulation on the adjacent mouse sex-limited protein gene. *Cell* 55, 247-254.

- STEINMEYER, K., R. KLOCKE, C. ORTLAND, M. GRONEMEIER, H. JOCKUSCH, S. GRÜNDER, T. JENTSCH (1991): Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* 354, 304-308.
- SUMMERBELL, D. (1973): Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 244, 492-496.
- THIEN, H., D. BÜSCHER, U. RÜTHER (1996): Cloning and sequence analysis of the murine *Gli3* cDNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1307, 267-269.
- TICKLE, C. (1995): Vertebrate limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 478-484.
- VAN DER HOEVEN, F., T. SCHIMMANG, A. VORTKAMP, U. RÜTHER (1993): Molecular linkage of the morphogenetic mutation *add* and the zinc finger gene *Gli3*. *Mam. Gen.* 4, 276-277.
- VAN DER HOEVEN, F., SCHIMMANG, T., VOLKMANN, A., MATTEI, M.-G., KYEWSKI, B., RÜTHER, U. (1994): Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant *Fused toes (Ft)*. *Development* 120, 2601-2607.
- VOGEL, A., RODRIGUEZ, C., WARNKEN, W., IZPISUA-BELMONTE, J. (1995): Dorsal cell fate specified by chick *Lmx1* during vertebrate limb development. *Nature* 378, 716-720.
- VOGEL, A., C. RODRIGUEZ, J. IZPISUA-BELMONTE (1996): Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development* 122, 1737-1750.
- VORTKAMP, A., M. GESSLER, K.-H. GRZESCHIK (1991): *GLI3* zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352, 539-540.
- VORTKAMP, A., T. FRANZ, M. GESSLER, K.-H. GRZESCHIK (1992): Deletion of *GLI3* supports the homology of the human Greig Cephalopolysyndactyly Syndrome (GCPS) and the mouse mutant extra toes (*Xt*). *Mammalian Genome* 3, 461-463.
- VORTKAMP A., M. GESSLER, K.H. GRZESCHICK (1995): Identification of optimized target sequences for the *GLI3* zinc finger protein. *DNA Cell Biol.* 14, 629-634.

- WAGNER, K., P. KROISEL, W. ROSENKRANZ (1990): Molecular and Cytogenetic Analysis in Two Patients with Microdeletions of 7p and Greig Syndrome: Hemizygoty for PGAM2 and TCRG Genes. *Genomics* 8, 487-491.
- WALCHNER, M., LEIB-MÖSCH, C., MESSER, G., KIND, P. (1996): Endogene retrovirale Sequenzen als Faktor in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes. *Hautarzt* 47, 502-509.
- WALTERHOUSE, D., M. AHMED, D. SLUSARSKI, J. KALAMARAS, D. BOUCHER, R. HOLMGREN, P. IANACCONE (1993): *gli*, a zinc finger transcription factor and oncogene, is expressed during normal mouse development. *Dev. Dyn.* 196, 91-102.
- WATANABE-FUKUNAGA, R., BRANNAN, C., COPELAND, N., JENKINS, N., NAGATA, S. (1992): Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- WEISS, S., JOHANSSON, B. (1989): Integration of the transposon-like element ETn upstream of V λ 2 in the cell line P3X63Ag8. *J. Immunol.* 143, 2384-2388.
- WETMUR, J.G. (1991): DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridisation. *Critical Rev. in Biochem. and Mol. Biol.* 26, 227.
- WILKINSON, D., MAGER, D., LEONG, J. (1994): Endogenous human retroviruses. In: *The Retroviridae*. Herausgeber J. Levy, Plenum Press, New York, London, 465-535.
- WINTER, R., S. HUSON (1988): Greig Cephalopolysyndactyly Syndrome: A possible mouse Homologue (*Xt-Extra Toes*). *Am. J. of Med. Gen.* 31, 793-798.
- WOLPERT, L. (1969): Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* 25, 1-47.
- WU J., T. ZHOU, J. HE, J. MOUNTZ (1993): Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene. *J. Exp. Med.* 178, 461-468.

YANG, Y., L. NISWANDER (1995): Interaction between the signalling molecules Wnt7a and Shh during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* 80, 939-947.

ZAKERI, Z., QUAGLINO, D., AHUJA, H. S. (1994): Apoptotic death in the mouse limb and its suppression in the Hammertoe mutant. *Dev. Biol.* 165, 294-297.

Lebenslauf

Schulbildung

- 1973 - 1977 Grundschule Lingen-Darme
- 1977 - 1977 Orientierungsstufe Lingen-Laxten
- 1979 - 1986 Gymnasium Georgianum in Lingen/Ems

Zivildienst

- 1986 - 1988 Krankentransport- und Rettungsdienst, Arbeiter-Samariter-Bund, Hannover

Studium

- Oktober 1988 Beginn des Studiums Biologie/Diplom im WS 88/89 an der Universität Würzburg
- April 1989 Wechsel zum SS 89 an die Universität Düsseldorf
- Februar 1991 Abschluß des Grundstudiums mit der Vordiplomprüfung
- April 1991 Wechsel zum SS 91 an die Universität Hannover
- April 1993 Diplomprüfung
- 1993 - 1994 Diplomarbeit im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin,
Abteilung für Molekulare Neuroendokrinologie, Göttingen

Promotion

- 1994 - 1997 als Stipendiat des Graduiertenkollegs "Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums"
am Institut für Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Prof. Rüther,
Medizinische Hochschule Hannover