

Aus dem Zentrum für Humangenetik
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik



**Punktmutationsanalysen bei GLI3-assoziierten
Krankheitsbildern:
Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom,
Pallister-Hall-Syndrom und isolierte Polydaktylien**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Stephanie Josephine Driess

aus Bobenthal

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 8.12.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

Korreferent: Prof. Dr. G. Suske

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Gliedmaßenentwicklung	3
2.1.1	Allgemeine Grundlagen der Gliedmaßenentwicklung	3
2.1.2	Molekularbiologische Grundlagen der Extremitätenentwicklung	4
2.1.3	Die Sonic Hedgehog-Patched-GLI (SHH-PTCH-GLI) Signalkaskade in der humanen Extremitätenentwicklung	7
2.2	GLI3 und seine Rolle in der Extremitätenentwicklung	9
2.2.1	Die humane <i>GLI</i> -Genfamilie	9
2.2.2	Struktureller und funktioneller Aufbau des GLI3 Transkriptionsfaktors	11
2.3	GLI3 assoziierte Morphopathien	12
2.3.1	Mutationen	12
2.3.2	Mutationen in Genen der SHH-Signalkaskade und assoziierte Fehlbildungssyndrome	15
2.3.3	Mutationen im <i>GLI3</i> -Gen als Ursache verschiedener Fehlbildungssyndrome	16
2.3.3.1	Das Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom	16
2.3.3.2	Das Pallister-Hall Syndrom	18
2.3.3.3	Die Postaxiale Polydaktylie	19
2.3.3.4	Die Präaxiale Polydaktylie Typ IV	20
2.4	Zielsetzung der Arbeit	21
3.	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Chemikalien	22
3.1.2	Enzyme und Nukleotide	23
3.1.3	Fertigsysteme	23
3.1.4	Puffer und Lösungen	23
3.1.5	Geräte und Zubehör	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	DNA	25
3.2.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten	25
3.2.1.2	Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	26
3.2.2	Standard Polymerase-Kettenreaktion	26
3.2.2.1	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion	27
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	29
3.2.3.1	Durchführung	29

3.2.4	Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA)	30
3.2.4.1	Prinzip der Einzelstrang-Konformations-Analyse	30
3.2.4.2	Herstellung eines Polyacrylamidgels für die SSCA	31
3.2.4.3	Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
3.2.4.4	Färben des SSCA-Gels	32
3.2.5	Isolierung von DNA aus Polyacrylamid-Gelen	32
3.2.6	Sequenzierung	33
3.2.6.1	Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger	33
3.2.6.2	Probenvorbereitung zur automatisierten Sequenzierung	34
3.2.6.3	Denaturierende Polyacrylamidgele zur automatisierten Sequenzierung	35
3.2.6.4	Auswertung der Sequenzanalysen	36
3.3	Patientenrekrutierung	37
4.	Ergebnisse	41
4.1	Mutationsanalysen im <i>GLI3</i>-Gen bei Krankheitsbildern mit bekannter und unbekannter <i>GLI3</i> Assoziation	41
4.2	Mutationen im <i>GLI3</i> -Gen von GCPS-Patienten	44
4.2.1	Nonsense-Mutationen bei GCPS-Patienten	44
4.2.2	Missense-Mutationen bei GCPS-Patienten	46
4.2.3	Spleißstellen-Mutationen bei GCPS-Patienten	48
4.2.4	Frameshift-Mutationen bei GCPS-Patienten	50
4.3	Mutationen bei Patienten mit klinisch diagnostiziertem PHS	52
4.4	Mutationen bei Patienten mit klinisch diagnostizierter PPD-IV	52
4.5	Ergebnisse der <i>GLI3</i> Mutationsanalyse in der Patientengruppe mit verschiedenen isolierten und syndromalen Polydaktylien	53
4.6	Zusammenfassung der identifizierten <i>GLI3</i>-Mutationen bei Patientengruppen mit unterschiedlichen <i>GLI3</i> assoziierten Krankheitsbildern	54
4.7	Polymorphismen	56
5.	Diskussion	59
5.1	<i>GLI</i>-Gene während der Extremitätenentwicklung und assoziierte Krankheitsbilder	59
5.2	Mutationen im <i>GLI3</i>-Gen und deren mögliche Auswirkung auf die Funktion des Proteins	60
5.2.1	Mutationen im N-terminalen- und ZFD-Bereich des <i>GLI3</i> -Gens	62
5.2.2	Mutationen im C-terminalen Bereich des <i>GLI3</i> -Gens	67
5.3	Interpretationsmöglichkeiten der erfolglosen Mutationssuche bei insgesamt 18 von 35 Patienten	70
5.3.1	Methodische Grenzen der Mutationsdetektion	70
5.3.2	Genetische Ursachen	71

5.4	Bewertung der identifizierten Mutationen im <i>GLI3</i>-Gen und Ausblick	72
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Abkürzungen	82
8.	Anhang	I
8.1	Primersequenzen	I
8.2	Curriculum vitae	III
8.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer	IV
8.4	Danksagung	V
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung	VI

1. Zusammenfassung

Für die Ausbildung der Extremitäten ist eine Vielzahl von Genen verantwortlich. Eine Schlüsselrolle in der Entstehung der anterior-posterioren Polarität der Extremitäten spielt die Sonic Hedgehog-Patched-GLI Signalkaskade (SHH-PTCH-GLI Signalkaskade). Kommt es durch Mutationen zur Fehlregulation eines der beteiligten Faktoren im SHH-Pathway, so resultieren in der Regel, aber nicht ausschließlich, Dymorphogenesen der Gliedmaßen. Zu diesen zählen auch die in dieser Arbeit untersuchten GLI3- assoziierten Morphopathien. Verschiedene Punktmutationen konnten im humanen *GLI3*-Gen (7p13), das für einen Transkriptionsfaktor mit Zinkfingermotiven kodiert, detektiert werden. Bisher wurden vier autosomal-dominant vererbte Fehlbildungssyndrome GLI3-Mutationen zugeordnet:

1. Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom (GCPS)
2. Pallister-Hall-Syndrom (PHS)
3. Postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A)
4. Präaxiale Polydaktylie Typ IV (PPD-IV)

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Fallzahlen der GLI3-assozierten Morphopathien erhöht werden. Als molekulargenetische Methode kamen für die Untersuchung der Patienten-DNA die nicht-radioaktive Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA) sowie die Sequenzierung zur Anwendung.

Insgesamt konnten 12 Mutationen bei Patienten mit klinisch diagnostiziertem GCPS, 2 Mutationen bei Patienten mit klinisch gesichertem PHS, sowie 2 weitere Mutationen bei Patienten mit PPD-IV im *GLI3*-Gen identifiziert werden. Dabei betreffen 9 Mutationen den N-Terminus oder die zentralen Zinkfinger motive der DNA-bindenden Domäne des GLI3-Transkriptionsfaktors. Weitere 7 Mutationen betreffen den C-terminalen Bereich. Die Erhöhung der Fallzahlen bestätigt und ergänzt das bekannte Spektrum der GLI3-Mutationen. Mindestens 8 der 16 detektierten Mutationen führen, durch den Einbau eines vorzeitigen Stoppcodons, zu einem verkürzten Protein und somit vermutlich zum Verlust einiger oder aller Funktionen des GLI3-Transkriptionsfaktors. Der

Mechanismus der Haploinsuffizienz scheint in diesen Fällen den Phänotyp zu bedingen.

Dagegen kann für die 4 identifizierten Missense-Mutationen sowie für die 3 Spleißstellenmutationen keine eindeutige Aussage über die Auswirkung auf Proteinebene und somit über den molekularen Mechanismus, der den Phänotyp bedingt, getroffen werden.

Entgegen der bisher angenommenen 100%igen Penetranz von *GLI3*-Mutationen konnte eine Mutationsübertragung über eine phänotypisch gesunde Probandin im Fall der Missense-Mutation R625W nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund einer nicht vollständigen Penetranz sollten in Zukunft auch seltene Sequenzvarianten auf Proteinebene hinsichtlich veränderter *GLI3* Funktionen und möglicher Interaktion mit anderen Faktoren untersucht werden.

Die Entstehung der unterschiedlichen Phänotypen durch Mutationen im *GLI3*-Gen bleibt weiterhin unklar, denn die erhobenen Daten von nunmehr annähernd 50 Mutationen lassen keine eindeutige Genotyp-Phänotyp Korrelation an Hand von Lage und Art der Mutationen zu. Zur Klärung könnten weiterführende Experimente auf funktioneller Ebene (mRNA Transkript- und Proteinebene) beitragen.

Drei Punktmutationen konnten mehrfach bei unverwandten Familien identifiziert werden, jedoch ist die Häufigkeit wiederholt auftretender Mutationen zu gering, um von sogenannten Mutations-Hotspots ausgehen zu können. Daher muss auch in Zukunft die molekulare Aufklärung von Defekten das gesamte *GLI3*-Gen erfassen.

2. Einleitung

2.1 Gliedmaßenentwicklung

2.1.1 Allgemeine Grundlagen der Gliedmaßenentwicklung

Die ähnliche Grundgestalt der Vertebraten ist auf konservierte anatomische Strukturen zurückzuführen. Die wichtigste bildet dabei eine segmentierte Wirbelsäule, die das Rückenmark in Form eines teils knöchernen teils knorpeligen Mantels schützt. Durch die Wirbelsäule wird die Hauptachse der Vertebraten festgelegt. Diese sogenannte *Anterior-Posteriore Achse* verläuft vom Kopf, dem anterioren Ende, über den Rumpf zum posterioren Ende (Schwanz, Beine) des Vertebraten. Die zweite wichtige Achse ist die *Dorso-Ventrale Achse*, die durch Bauch und Rücken verläuft. Die ventrale Seite der *Dorso-Ventralen Achse* wird durch den Mund definiert. Durch die *Anterior-Posteriore-* und die *Dorso-Ventrale-Achse* wird gleichzeitig die rechte und linke Seite des Vertebraten festgelegt. Eine weitere Körperachse bildet die *Proximo-Distale Achse*, wobei proximal mit körpernah und distal mit körperfern gleichzusetzen ist.

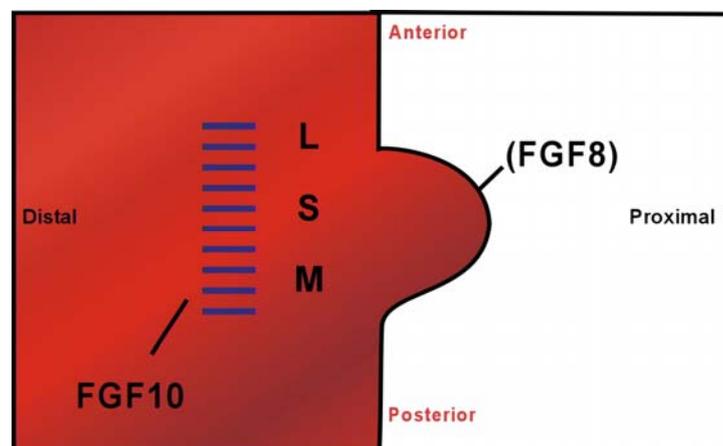
Die Extremität der Vertebraten besteht aus einer Wurzel (Zonoskeleton), einem proximalen Segment (Stylopodium) mit einem Knochen (Humerus, Femur), einem mittleren Segment (Zeugopodium) mit zwei Knochen (Radius und Ulna bzw. Tibia und Fibula) und einem distalen, komplexen Bereich (Autopodium, Hand oder Fuß). Die Ausbildung der Gliedmaßen während der Ontogenese geht von einer Extremitätenknospe aus und verläuft bei allen Vertebraten nach den gleichen Organisationsprinzipien, so dass experimentelle Erkenntnisse vom Tiermodell auf den Menschen übertragen werden können.

Untersuchungen zur Extremitätenentwicklung zeigten, dass die Entwicklung der Extremität beim Menschen in der 4. Entwicklungswoche beginnt. Ursprung der Entwicklung bildet dabei die Extremitätenknospe des Embryos. Diese besteht aus dem Oberflächenektoderm und einem Mesenchymkern, der aus dem parietalen Mesoderm des Embryos hervorgeht. Das Ektoderm am distalen Rand dieser Knospe verdickt sich zur sog. Apikalleiste (Apical ectodermal ridge; AER). Molekulare Wechselwirkungen zwischen Apikalleiste und Mesenchym steuern das Längenwachstum der Extremitätenknospe (siehe 2.1.2). Am Anfang der 6. Woche

entsteht die Hand-, bzw. Fußplatte, an denen sich durch Mesenchymverdichtungen Finger und Zehen entwickeln. Die Muskulatur entwickelt sich anschließend in der 7. Woche aus Myoblasten, deren Ursprung in den Dermatomen der embryonalen Somiten liegt. Mit der Ausbildung eines hyalin-knorpeligen Skeletts aus mesenchymalen Anlagen, ist die strukturelle Entwicklung der Gliedmaßen beim Menschen in der 8. Embryonalwoche abgeschlossen.

2.1.2 Molekularbiologische Grundlagen der Extremitätenentwicklung

Damit die vier Segmente einer Extremität (Zonoskeleton, Stylopodium, Zeugopodium, Autopodium; siehe 2.1.1) zeitlich und räumlich koordiniert angeordnet werden, müssen regulatorisch wirkende Signalproteine zu definierten Zeitpunkten in spezifischen Geweben des Embryos exprimiert werden. So induziert beispielsweise die Bildung des Fibroblastenwachstumsfaktors 10 (Fibroblast Growth Factor, FGF) im lateralen Seitenmesoderm die Expression von FGF 8 im noch undifferenzierten Oberflächenektoderm. Damit wird die Entwicklung der Extremitätenknospe eingeleitet (siehe Abb. 2.1).



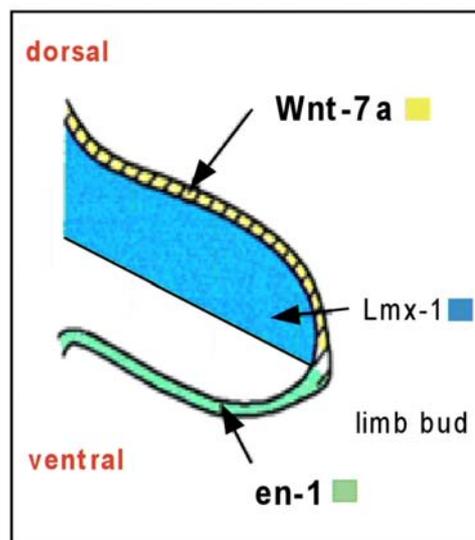
Im frühen Stadium der Knospenbildung ist lediglich eine kleine Ausstülpung von mesodermalem Gewebe (LSM, laterales Seitenmesoderm) zu erkennen, welches eine Expression des Fibroblastenwachstumsfaktor 10 (FGF 10) zeigt. Die Anwesenheit von FGF 10 induziert die Expression von FGF 8 im noch undifferenzierten Oberflächenektoderm.

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Entstehung einer Gliedmaßenknospe

Die Expression weiterer spezifischer Signalproteine zu definierten Entwicklungszeitpunkten ist schließlich für die Achsenbildung der Extremität

verantwortlich (Zusammenfassung bei Innis und Mortlock, 1998; Hogan, 1999; Riddle und Tabin, 1999 und Manouvrier-Hanu *et al.*, 1999):

- **Dorso-Ventrale Achse (D-V Achse):** Die Spezifizierung mesodermaler Zellen entlang der dorso-ventralen Achse wird durch das Protein *Lmx-1* aus Zellen des dorsalen Mesenchyms beeinflusst. Die Expression von *Lmx-1* wird von *Wnt-7A*, das in Zellen des dorsalen Ektoderms exprimiert wird, induziert (Johnson und Tabin, 1997). *Engrailed-1 (En-1)* wird dagegen in Zellen des ventralen Ektoderms exprimiert und determiniert deren Position. Außerdem wirkt *En-1* aus Zellen des ventralen Ektoderms reprimierend auf die Expression von *Wnt-7a* im Ektoderm. Dadurch wird die *Lmx-1* Expression auf das dorsale Mesenchym beschränkt und die dorsale Musterbildung garantiert (siehe Abb. 2.2). Vermutlich spielen noch andere Transkriptionsfaktoren in der Ausbildung der Dorso-Ventralen-Achse eine Rolle.



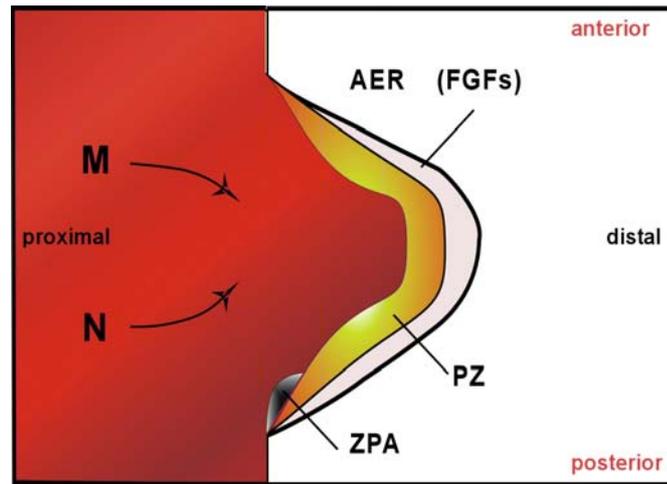
Wnt-7a wird im dorsalen Ektoderm sezerniert. *Engrailed-1 (En-1)* wird von Zellen des ventralen Ektoderms exprimiert und determiniert deren Position. *Wnt-7a* induziert die Expression von *Lmx-1* im dorsalen Mesenchym und wird gleichzeitig durch *En-1* aus dem ventralen Ektoderm unterdrückt. Auf diese Weise restringieren *Wnt-7a* und *En-1* zusammen die *Lmx-1* positive Domäne (nach Johnson und Tabin, 1997).

Abbildung 2.2: Genexpression entlang der dorso-ventralen Achse der Extremitätenknospe

- **Proximo-Distale-Achse (P-D-Achse):** Die Entwicklung der P-D Achse wird mit der Bildung einer spezialisierten Apikalleiste eingeleitet (zusammengefaßt in Cohn *et al.*, 1996; Manouvrier-Hanu *et al.*, 1999). Die

AER liegt an einer Grenzfläche des ventral/dorsal determinierten Gewebes an der äußersten Ausstülpung der Extremitätenknospe und ist für das kontinuierliche distale Wachstum verantwortlich. Die Position der Randleiste wird durch die Signalfaktoren *Engrailed-1* (En-1) und *Radical fringe* (r-Fng) reguliert (Johnson und Tabin, 1997). Das Wachstum der Extremitätenknospe hingegen wird durch FGFs induziert. Diese stimulieren das unter der AER liegende Mesenchym zur Proliferation. So entsteht eine Wachstumszone (progress zone; PZ) (siehe Abb. 2.3). Alle Zellen, die diese Wachstumszone verlassen, sind in ihrer Position auf der proximo-distalen Achse festgelegt. Das distale Wachstum wird durch die konstitutive Sekretion von *Sonic Hedgehog* (*SHH*) in bestimmten mesenchymalen Anteilen der Extremitätenknospe aufrechterhalten. Die Extremitätenknospe bildet nun eine unabhängige sich selbst organisierende Einheit. Zu diesem Zeitpunkt wandern auch erste Nerven- (N) und Muskel-Vorläuferzellen (M) in die Extremitätenknospe ein (siehe Abb. 2.3).

- **Anterior-Posteriore Achse (A-P-Achse):** Die Ausrichtung von Zellen entlang der Anterior-Posterioren Achse der Gliedmaßen wird beeinflusst durch eine Zone polarisierender Aktivität (Zone of Polarizing Activity; ZPA), die am postero-distalen Rand der Extremitätenknospe lokalisiert ist (siehe Abb 2.3). Die Entstehung der ZPA wird von Faktoren aus dem seitlichen Mesenchym induziert. Die Polarisationsaktivität der ZPA wird von *SHH* gesteuert (Riddle *et al.*, 1993) (siehe 2.1.3). Verschiedene Mediatoren wie z.B. *HOX-Proteine* [Homeobox proteins (HoxD11, -12, -13)], BMPs (bone morphogenetic proteins), Transmembranproteine wie Patched (PTCH) und die Transkriptionsfaktoren der GLI-Familie interagieren mit *SHH*, um den Gliedmaßenbau zu gewährleisten (siehe 2.1.3).



Die apikale ektodermale Leiste (AER) hat sich entlang der anterior-posterioren Achse des Knospenektoderms etabliert. Die Sekretion von FGFs aus Zellen der AER sorgt für die kontinuierliche Proliferation der Wachstumszone (progress zone; PZ) in distale Richtung. Die „zone of polarizing activity“ (ZPA; Polarisierungszone) determiniert durch die Sekretion von Sonic hedgehog (SHH) die anterior-posteriore-Achse der Extremitätenknospe. Zu diesem Zeitpunkt beginnen neurale (N) und muskuläre (M) Vorläuferzellen in die Gliedmaßenknospe einzuwandern (nach Innis und Mortlock, 1998).

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Mechanismen der Proximo-Distalen- sowie der Anterior-Posterioren Musterbildung

2.1.3 Die Sonic Hedgehog-Patched-GLI (SHH-PTCH-GLI) Signalkaskade in der humanen Extremitätenentwicklung

Die Mechanismen zur Regulation und Steuerung der Embryonalentwicklung beim Menschen sind nur teilweise aufgeklärt. Ein großer Teil dieser Informationen stammt aus der Aufklärung homologer Mechanismen in Modellsystemen. Zum Verständnis molekularer Vorgänge haben sowohl Studien bei Invertebraten, wie z.B. der Taufliege *Drosophila melanogaster*, als auch bei Vertebraten, wie z.B. Maus und Huhn, beigetragen.

Eine zentrale Signalkaskade in der Regulation von Zelldifferenzierungsprozessen während der Embryonalentwicklung in Vertebraten bildet die Sonic Hedgehog-Patched-GLI (SHH-PTCH-GLI)-Signalkaskade. Viele Proteine dieses Signalwegs sind speziesübergreifend konserviert, was auf eine zentrale regulatorische Funktion dieser Kaskade in der Entwicklung hinweist. Das Sonic Hedgehog-Protein (SHH) spielt in der Extremitätenentwicklung bei der Festlegung der anterior-posterioren Polarität eine zentrale Rolle (siehe 2.1.2). SHH wird in der Zone polarisierender Aktivität (ZPA) der Extremitätenknospe exprimiert (siehe 2.1.2).

In der humanen SHH-Signalkaskade wird das SHH-Protein aktiviert, indem es in eine N-terminale Form gespalten und über die Bindung eines Cholesterolrestes modifiziert wird (Pepinsky *et al.*, 1998). Das so aktivierte SHH-Protein bindet an die Transmembranrezeptoren PATCHED-1 (PTCH-1) und PATCHED-2 (PTCH-2) auf den Zielzellen (Stone *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 1999). PTCH-1 und möglicherweise PTCH-2 inhibieren in Abwesenheit des SHH Signals konstitutiv das Transmembranprotein SMOOTHENED (SMO). In Modellsystemen beobachtete man, dass die PTCH-induzierte Hemmung von SMO durch die Bindung von aktiviertem SHH aufgehoben wird (Murone *et al.*, 1999). Dadurch wird ein intrazellulärer Signalweg eingeleitet, der schließlich über Transkriptionsfaktoren der GLI-Familie die transkriptionelle Aktivität der Zielzelle steuert. Bisher ist noch nicht bekannt, durch welche Proteine im einzelnen die Signale von SHH via PTCH an die humanen GLI-Proteine weitergeleitet werden.

Im *Drosophila melanogaster* Modellsystem wurde eine homologe Signalkaskade untersucht, in der das Protein ‚Hedgehog‘ (Hh) die Signalkaskade steuert. Das Hh-Protein nimmt, wie sein Vertebratenhomolog SHH, über komplexe Signalwege Einfluß auf die Zelldifferenzierung zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. An der Signaltransduktion von Hh via PTCH an das GLI-Homolog *Cubitus interruptus* (*Ci*) im *Drosophila melanogaster*-System sind die Proteinkinasen Fused (*Fu*), Supressor of Fused [*Su(Fu)*] und das Protein Costal-2 (*Cos-2*) beteiligt. Die Proteinkinasen *Fu* und *Su(Fu)* bilden mit *Ci* einen zytoplasmatischen Komplex, der über das Protein *Cos-2* an den Mikrotubuli verankert ist (Robbins *et al.*, 1997; Sisson *et al.*, 1997). Dies führt zur Abspaltung eines aminoterminalen Fragmentes von 75 kDa (*Ci-75*), das im Nukleus als Repressor für Hh-Zielgene fungiert (Aza-Blanc *et al.*, 1997). Diese Proteolyse erfolgt allerdings nur dann, wenn vorher eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) stattfindet (Chen *et al.*, 1999; Price und Kalderon, 1999).

Zunächst konnten weder *Cos-2*- noch *Fu*-Homologe in Vertebraten nachgewiesen werden, jedoch wurde für die Proteinkinase *Su(Fu)* ein humanes Homolog isoliert (Stone *et al.*, 1999). Noch ist unklar, ob die Proteinkinase *Su(Fu)* innerhalb der SHH-PTCH-GLI Signalkaskade aktiv ist oder ob sie unabhängig von SHH als Regulator des GLI-vermittelten Signalweges wirkt.

Dem Vergleich zwischen dem Vertebratensystem und dem Modellsystem *Drosophila melanogaster* mit *Ci* als GLI3 Homolog sind jedoch Grenzen gesetzt.

Die Regelkreisläufe im Vertebratensystem sind komplexer, da die GLI-Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3 im SHH-Signalweg interagieren. Zudem sind für den Menschen mindestens drei verschiedene homologe Genprodukte zum Hedgehog-Protein beschrieben: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) und Desert Hedgehog (DHH) (Echelard *et al.*, 1993; Hammerschmidt, 1997).

2.2 GLI3 und seine Rolle in der Extremitätenentwicklung

2.2.1 Die humane GLI-Genfamilie

Zur humanen *GLI*-Genfamilie gehören die Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3. Aufgrund der Homologie zu den murinen Proteinen Gli1, Gli2 und Gli3, wird ihnen ebenfalls eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Extremitäten, des Schädels, der Lunge, der Zähne sowie der Gestaltung des ZNS und der Sinnesorgane zugeordnet. Die hohe Konservierung von Protein-Domänen innerhalb der Gli-Proteine lässt auf ähnliche Funktionen schließen.

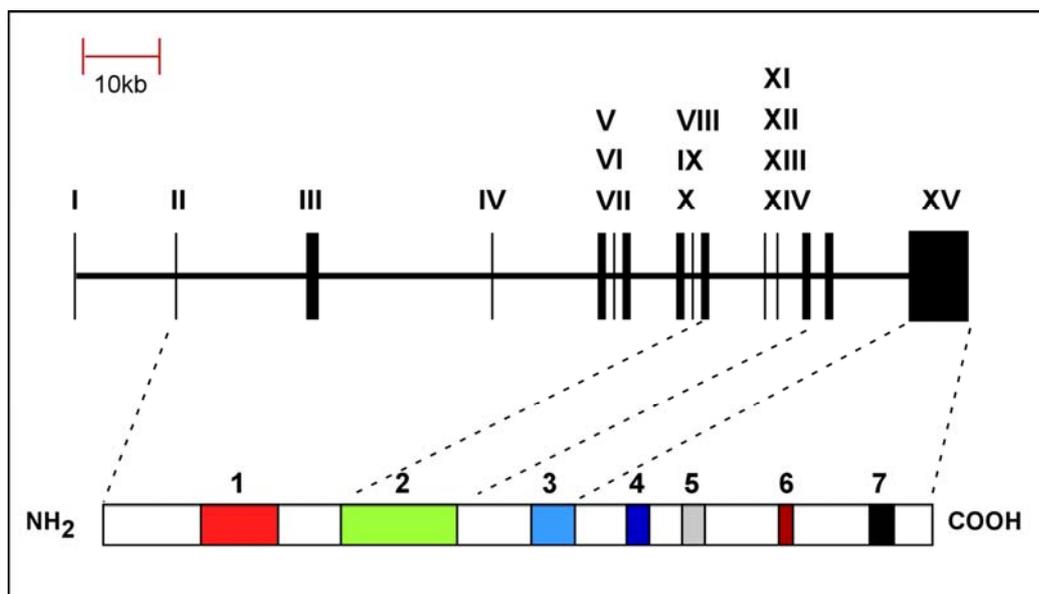
Zunächst wurde von Kinzler *et al.* das *GLII*-Gen (früher: *GLI*) aus menschlichen Glioblastomazellen kloniert (Kinzler *et al.*, 1987). Das humane *GLII* ist auf Chromosom 12q13 lokalisiert und wurde als Onkogen klassifiziert (Ruppert *et al.*, 1991).

Das humane *GLI2* liegt auf Chromosom 2q14. Gliedmaßenfehlbildungen, die mit Defekten des GLI2-Transkriptionsfaktors assoziiert sind, konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Neuere Studien an Mäusen lassen jedoch einen Zusammenhang zwischen GLI2-Defekten und Erkrankungen wie z.B. Basalzellkarzinomen und Skelettfehlbildungen vermuten (Sasaki *et al.*, 1999; Grachtchouk *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000).

Der GLI3-Transkriptionsfaktor wird von einer 240 kb langen Sequenz auf Chromosom 7p13 kodiert. Die 15 Exons des *GLI3*-Gens werden in eine 8,5 kb lange mRNA transkribiert, die für ein Protein mit 1580 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 190 kD kodiert (Kinzler *et al.*, 1990; Ruppert *et al.*, 1990; Vortkamp *et al.*, 1995 b). Im proximalen Bereich des *GLI3*-Gens liegen kurze, von zum Teil sehr langen Introns unterbrochene Exonbereiche. Das am weitesten 3'-gelegene Exon umfasst dagegen ungefähr die Hälfte der kodierenden Information. Das Startkodon der Translation befindet sich im Exon II (Nukleotide 43-45 der

cDNA). Exon I und Teile von Exon II befinden sich in einem 5'-untranslatierten Bereich. Eine 2 kb große CpG-Insel flankiert das *GLI3*-Gen im 5' Bereich. Ein 230 bp langes Fragment mit spezifischer Promotoraktivität, welches 320 bp vor dem Translationsstart liegt, reguliert die Transkriptionsaktivität über ein Initiationselement (Jacobsen, 1996).

Die Transkriptionsfaktoren der GLI Genfamilie enthalten alle eine hoch konservierte Zinkfingerdomäne mit fünf Zinkfingermotiven (Ruppert *et al.*, 1988). Zinkfinger sind DNA-bindende Strukturen, die durch ein zentrales, in den meisten Fällen von zwei Cystein- und zwei Histidinresten (C₂/H₂-Finger) gebundenes Zn²⁺-Ion, gebildet werden. Die drei GLI-Faktoren erkennen eine identische 9-bp DNA-Sequenz (-TGGGTGGTC-), über die Zielgene reguliert werden können (Kinzler and Vogelstein 1990; Ruppert *et al.* 1990; Paveletich and Pabo 1993; Vortkamp *et al.*, 1995b). In Abbildung 2.4 ist der strukturelle Aufbau des *GLI3*-Gens, sowie des *GLI3*-Transkriptionsfaktors schematisch dargestellt.

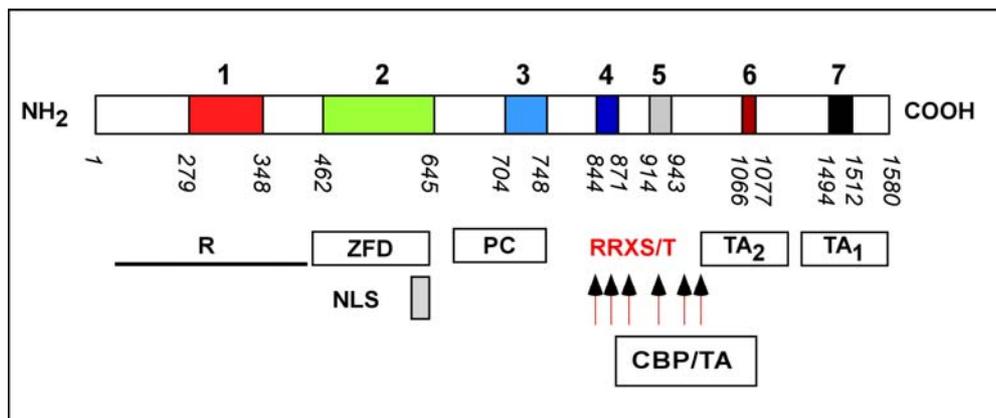


Im oberen Teil der Abbildung ist die genomische Struktur des *GLI3*-Gens dargestellt. Die 15 Exons sind als Balken gekennzeichnet und mit römischen Ziffern nummeriert (Exon I-XV). Die Introns sind maßstabgerecht als horizontale Linien zwischen den Exons wiedergegeben. Im unteren Teil der Abbildung ist der *GLI3*-Transkriptionsfaktor schematisch dargestellt. Die 7 Regionen, die innerhalb der GLI-Familie eine hohe Konservierung aufweisen, sind mit arabischen Ziffern markiert.

Abbildung 2.4: Struktureller Aufbau des *GLI3*-Gens und des *GLI3*-Proteins

2.2.2 Struktureller und funktioneller Aufbau des GLI3-Transkriptionsfaktors

Der GLI3-Transkriptionsfaktor enthält neben der charakteristischen Zinkfingerdomäne (ZFD) zwei weitere Regionen hoher Konservierung zum *Drosophila melanogaster*-Protein *Cubitus interruptus* (Ci). Diesen konnten bislang, im Gegensatz zur ZFD (aa 462-645), keine Struktur motive bzw. Funktionen zugeordnet werden. Auch innerhalb der humanen *GLI*-Genfamilie (siehe 2.2.1) sind neben der Zinkfingerdomäne noch 6 weitere Regionen hoch konserviert (Ruppert *et al.*, 1990). Zum Teil konnten diese konservierten Bereiche als gemeinsame Struktur motive der *GLI*-Genfamilie ausgemacht werden. In Abbildung 2.5 sind die strukturellen und die davon abgeleiteten bzw. experimentell nachgewiesenen Funktionen des GLI3-Proteins schematisch zusammengefasst.



Schematische Darstellung des humanen GLI3-Proteins. Die bisher bekannten strukturellen Motive und funktionellen Eigenschaften sind unterhalb der Domänen angegeben. Die nummerierten Proteinabschnitte 1-7 in GLI3 repräsentieren die Homologiebereiche innerhalb der *GLI*-Genfamilie (siehe 2.2.2). Die Domänen des GLI3-Proteins sind durch die erste und letzte Aminosäure der jeweiligen Region gekennzeichnet. Der DNA-bindende Bereich (ZFD, Zinkfingerdomäne) entspricht der Region 2 im GLI3-Protein. Innerhalb dieser Zinkfingerregion findet man das Kernlokalisierungssignal (NLS). C-terminal der ZFD befinden sich eine CBP-bindende Region (CBP) und eine Region der proteolytischen Spaltstellen (PC). Außerdem befinden sich im mittleren Teil des Proteins mehrere durch Pfeile gekennzeichnete PKA-Konsensusphosphorylierungsstellen (RRXS/T). Es befinden sich zudem zwei unabhängige, transaktivierende Bereiche TA₁ und TA₂ C-terminal. Während TA₁ eine α -helicale saure amphipathische Helix enthält, überlappt TA₂ teilweise mit dem CBP bindenden Bereich. Die Repression (R) wird durch den N-Terminus vermittelt.

Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des GLI3-Proteins

Überlappend mit dem C-Terminus der ZFD befindet sich ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (NLS), welches den gerichteten Transport in den Zellkern vermittelt (Wang *et al.*, 2000). Die Induktion der Kompartimentierung soll vor allem

über die Proteinkinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung und die dann mögliche proteolytische Spaltung erfolgen (Chen *et al.*, 1999; Price und Kalderon, 1999). Mehrere Konsensusphosphorylierungssequenzen (RRXS/T) befinden sich im mittleren Teil des Proteins (Kemp *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 1999). Hinweise auf eine Sequenz zur posttranslationalen proteolytischen Spaltung von Ci und GLI3 (PC, proteolytic cleavage) konnten im C-terminalen Bereich zur ZFD nachgewiesen werden (Aza-Blanc *et al.*, 1997 und 2000; Dai *et al.*, 1999). Diese proteolytische Spaltstelle wird im Ci-Protein, in Abwesenheit von Hedgehog (Hh), zur Spaltung von Ci in ein verkürztes, reprimierend auf Zielgene wirkendes Fragment benötigt. Für GLI3 wird eine Spaltung des Gesamtproteins, ähnlich wie sie für Ci erfolgt, postuliert. Während das Gesamtprotein im Cytoplasma lokalisiert bleibt, soll der abgespaltene GLI3-N-Terminus eine Repressorfunktion der Zielgene im Nukleus ausüben (Wang *et al.*, 1999).

Zwei transaktivierende Domänen konnten im C-Terminus des GLI3-Proteins nachgewiesen werden. Eine Transaktivierungsdomäne TA₁ enthält eine saure amphipatische Helix (aa 1495-1512). Letztere ist überlappend mit Region 7. Die Aminosäuren 1044-1322 bilden eine weitere Transaktivierungsdomäne TA₂. Allerdings gibt es eine Überlappung dieses Bereiches mit demjenigen, der für die Bindung des Transkriptionskoaktivators CBP (CREB binding protein) charakterisiert wurde. Ein konserviertes Strukturmotiv konnte für diesen zweiten Bereich noch nicht gezeigt werden (Kalff-Suske *et al.*, 1999). Die Bindungsdomäne für den Transkriptionskoaktivator CBP befindet sich zwischen den Aminosäurepositionen 827-1132 im GLI3-Protein. Durch die Bindung des Transkriptionskoaktivators CBP an GLI3 wird die Aktivität von GLI3 erhöht (Dai *et al.*, 1999). Eine repressorisch wirkende Domäne des GLI3 wird im N-terminalen Bereich der ersten 344 Aminosäuren postuliert (Alexandre *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 1999).

2.3 GLI3 assoziierte Morphopathien

2.3.1 Mutationen

Die Erbinformation ist durch die Basensequenz der DNA kodiert. Deshalb wirken Veränderungen dieser Basensequenz erbgutverändernd (mutagen). Mutationen sind erbliche Veränderungen der genetischen Information. Sie sind selten, da sonst die

Konservierung und Weitergabe genetischer Informationen von Generation zu Generation nicht möglich wäre. Gleichzeitig ist die genomische DNA ständigen Veränderungen unterworfen. Früh in der Evolution haben sich deshalb wirkungsvolle DNA-Reparatur-Mechanismen entwickelt, die Schäden an der DNA identifizieren und reparieren, und somit die Häufigkeit von Mutationen reduzieren. Während Mutationen einerseits für betroffene Gene oft einen Funktionsverlust des entsprechenden Genproduktes bedingen, stellen sie andererseits einen der entscheidenden Faktoren der biologischen Evolution dar.

Man unterscheidet Chromosomenaberrationen von sogenannten Punktmutationen. Zu den Chromosomenaberrationen gehören:

- **Translokationen:** Verlagerung eines Chromosomen-Stücks von seinem ursprünglichen Ort auf ein anderes Chromosom oder eine andere Stelle innerhalb des gleichen Chromosoms.
- **Deletion:** Verlust von Abschnitten eines Chromosoms.
- **Insertion:** Einbau eines DNA-Fragmentes in ein Chromosom.
- **Inversion:** Umkehrung eines Chromosomen-Abschnittes um 180°.

Umfangreiche genomische Veränderungen können durch zytogenetische Methoden identifiziert werden.

Punktmutationen werden in verschiedene Klassen unterteilt. Oft wird die genetische Information durch den Austausch (Substitution) eines Nukleotids in ein anderes Nukleotid verändert. Die Substitutionen betreffen gewöhnlich eine Base; dieser Basenaustausch auf DNA-Ebene wird in zwei Kategorien unterteilt. Bei der häufiger vorkommenden Transition wird eine Pyrimidin-Base (Cytosin, Thymin, Uracil) durch eine andere Pyrimidin-Base oder eine Purin-Base (Adenin; Guanin) durch eine andere Purin-Base ersetzt. Die seltenere Transversion bezeichnet den Austausch einer Pyrimidin- gegen eine Purin-Base, oder umgekehrt. Die verschiedenen Konsequenzen, die ein Basenaustausch für das Genprodukt haben kann, sind im folgenden zusammengefaßt:

- **„Stumme“ Mutation:** Ein Nukleotid-Austausch kann „stumm“ bleiben, wenn ein Codon in ein synonymes Codon umgewandelt wird, das aufgrund des redundanten Charakters des genetischen Codes für die gleiche Aminosäure kodiert wie das Ausgangscodon. Die Primärsequenz (Aminosäurenreihenfolge) des Proteins bleibt somit unverändert.

- **„Falsch-Sinn“ (Missense)-Mutation:** Kommt es durch den Austausch eines Nukleotids zum Einbau einer anderen Aminosäure in das vom Gen kodierte Protein, so spricht man von einer Missense-Mutation. Dieser Aminosäureaustausch kann je nach Art und Lage sehr unterschiedliche Folgen haben. Werden zwei chemisch ähnlich aufgebaute Aminosäuren ausgetauscht (konservative Substitution) muß dies nicht unbedingt Einfluß auf die Protein-Funktion haben. Eine nicht-konservative Substitution führt zum Austausch zweier Aminosäuren mit unterschiedlichen strukturellen und chemischen Eigenschaften, was einen Funktionsverlust oder aber auch Funktionszugewinn des Proteins zur Folge haben kann. Dies ist vorwiegend der Fall, wenn der Aminosäureaustausch eine funktionelle Domäne des Proteins betrifft.
- **„Unsinn“ (Nonsense)-Mutation:** Nonsense-Mutationen sind durch die Synthese unvollständiger Proteinfragmente gekennzeichnet. Durch die Basensubstitution entsteht ein vorzeitiges Translations-Stoppcodon in der DNA-Sequenz, welches zu einem vorzeitigen Translationsstopp während der Proteinsynthese führt. Nonsense-Mutationen führen meist zum vollständigen Funktionsverlust des Proteins.

Häufig handelt es sich bei Punktmutationen um kleine Deletionen und Additionen (Insertionen) von einem oder mehreren Nukleotiden (bis zu 20). Durch Deletionen oder Insertionen kommt es zur Veränderung der Codonabfolge. Wird der Triplet-Takt, mit dem die Information bei der Proteinbiosynthese übersetzt wird, verschoben, kommt es zu einem Leseraster-Wechsel in der Translation (frameshift). Die Folge ist, dass eine andere Aminosäuresequenz 3' der Mutation synthetisiert wird und es darüber hinaus oft zum Abbruch der Proteinbiosynthese durch die Einführung eines vorzeitigen für einen Translationsstopp kodierenden Codons kommt.

Bei der Spleißstellenmutation (splice site mutation) betrifft die Sequenzveränderung einen stark konservierten Bereich des Exon-Intron- bzw. des Intron-Exon-Übergangs. Die Konsensussequenz am 5'-Ende des Exon-Intron-Übergangs von Vertebraten ist AG-GTAAAGT. Am folgenden 3'-Ende des Intron-Exons Übergangs ist die Konsensussequenz ein Abschnitt von zehn Pyrimidinnukleotiden (Thymidin, Cytidin), denen eine beliebige Base, ein Cytidin, sowie ein konserviertes AG folgen (Padgett *et al.*, 1986). Veränderungen im Bereich dieser Konsensussequenz führen

zu veränderten Spleißvorgängen. Mutationen, die weit von den Spleißstellen entfernt liegen, führen nur dann zu aberranten Spleißmustern, wenn die Veränderungen eine untypische Spleißstelle generieren.

2.3.2 Mutationen in Genen der SHH-Signalkaskade und assoziierte Fehlbildungssyndrome

Kommt es durch Mutationen zur Fehlregulation eines der Faktoren im SHH-Pathway (siehe 2.1.3), so resultiert daraus eine der als HSDs (Hedgehog signaling related diseases) bezeichneten Hedgehog-vermittelten Erkrankungen. Diese können, abhängig vom betroffenen Mitglied der Hedgehog-Signalkaskade zu unterschiedlichen Phänotypen führen (siehe Tabelle 2.1). Zu den HSDs zählen auch die in dieser Arbeit untersuchten GLI3-assoziierten Morphopathien, die in der Übersichtstabelle zu den HSDs gelb hervorgehoben sind.

Gen	Funktion	Dysmorphie	Extremitätenphänotyp
SHH	sezerniertes Signalprotein	HPE3	
PTCH	SHH-Rezeptor	Gorlin-Goltz-Syndrom	kurze Finger Polydaktylie
δ-7-Sterol-Reduktase	*	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom	Polydaktylie variable Defekte
BMP7	sezerniertes Signalprotein		Präaxiale Polydaktylie
GLI3	TF	GCPS PHS PAP-A PP IV	Polydaktylie, Syndaktylie Polydaktylie, Syndaktylie Polydaktylie, Syndaktylie Polydaktylie, Syndaktylie
CBP	Co-Aktivator	Rubinstein-Taybi-Syndrom	breite Daumen und Großzehen mit Verschmelzung der Phalangen

SHH (Sonic hedgehog), PTCH (Patched), BMP7 (bone morphogenetic protein), TF (Transkriptionfaktor), GCPS (Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom), PHS (Pallister-Hall-Syndrom), PAP-A (Postaxiale Polydaktylie Typ A)

HPE3 (Holoprosenzephalie; Menschen, die heterozygot sind, haben einen Holoprosenzephalon ohne Extremitätendefekte)

* defekter Cholesteroll-Metabolismus beeinträchtigt evt. die post-translationale Prozessierung von SHH.

Tabelle 2.1: Mutationen in Genen der SHH-Signalkaskade und assoziierte Krankheitsbilder (HSDs; Hedgehog signaling related diseases)

2.3.3 Mutationen im *GLI3*-Gen als Ursache verschiedener Fehlbildungssyndrome

Verschiedene Punktmutationen konnten im humanen *GLI3*-Gen von Patienten mit unauffälligem Chromosomenbefund detektiert werden. Die Punktmutationen sind über das gesamte Gen verteilt und führen in ihrer phänotypischen Ausprägung zu vier autosomal-dominant vererbten Fehlbildungssyndromen:

1. Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom (GCPS) (Wild *et al.*, 1997)
2. Pallister-Hall-Syndrom (PHS) (Kang *et al.*, 1997 b; Radhakrishna *et al.*, 1999)
3. Postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A) (Radhakrishna *et al.*, 1997 b)
4. Präaxiale Polydaktylie Typ IV (PPD IV) (Radhakrishna *et al.*, 1999)

Die meisten klinischen Charakteristika dieser Krankheitsbilder sind verschieden, doch ihnen gemeinsam sind Fehlbildungen der Extremitäten, speziell die Polydaktylie. Gemeinsam ist ebenfalls der dominante Erbgang mit hoher Penetranz. Die Expressivität der klinischen Charakteristika ist sowohl innerhalb als auch zwischen den betroffenen Familien sehr variabel.

Biesecker postulierte eine Assoziation zwischen Lokalisation der Mutation im *GLI3*-Gen und der phänotypischen Ausprägung (Biesecker, 1997). Untersuchungen einer größeren Fallzahl widerlegten jedoch diese These, da sie keine Assoziation zwischen der Lokalisation der Mutation im Gen und dem daraus resultierenden Phänotypen zuließen (Kalff-Suske *et al.*, 1999, Radhakrishna *et al.*, 1999). Aufgrund der fehlenden Genotyp-Phänotyp-Korrelation und der unklaren Grenzen der phänotypischen Charakterisierung wurde vorgeschlagen, alle mit *GLI3*-Mutationen assoziierten Syndrome als *GLI3* Morphopathien zu bezeichnen (Radhakrishna *et al.*, 1999).

2.3.3.1 Das Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom

Das Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom (GCPS, MIM 175700) ist ein seltener, autosomal-dominant vererbter Fehlbildungskomplex, bestehend aus Schädel- und Gesichtsdysmorphien, kombiniert mit Fehlbildungen der Extremitäten. Dieser Symptomkomplex wurde erstmals 1926 vom schottischen Arzt David M. Greig beschrieben. Eine Familienstudie, die von Temtamy und McKusick 1978 initiiert

wurde, belegte erstmals den autosomal-dominanten Vererbungsmodus des Fehlbildungskomplexes.

Bis heute gibt es keine einheitlichen Kriterien zur klinischen Diagnostik von GCPS. Leslie G. Biesecker von den National Institutes of Health (NIH) erstellte Richtlinien zur klinischen Beschreibung des Fehlbildungskomplexes GCPS (<http://www.geneclinics.org:8080/profiles/gcps/details.html>), die im folgenden zusammengefasst sind:

1. **Polydaktylien:** Die präaxiale Polydaktylie sollte mindestens durch einen abnormal breiten oder verdoppelten Daumen bzw. große Zehe repräsentiert sein. Die postaxiale Polydaktylie unterteilt sich in Typ A (funktionstüchtiger kleiner Finger) und Typ B (Postminus ohne Funktion).
2. **Hypertelorismus:** Diese Schädelanomalie ist durch einen vergrößerten Augenabstand (interpupilläre Distanz > 97. Perzentile für Alter und Geschlecht) und einen verbreiterten Nasenrücken klinisch charakterisiert.
3. **Makrozephalie:** Von einer Makrozephalie spricht man, wenn der occipitofrontale Kopfumfang die 97. Perzentile für Alter und Geschlecht überschreitet.
4. **Syndaktylien:** An der Hand betrifft die Syndaktylie den 3. und 4. Finger oder die Finger 1 und 2. Die Füße sind von der Syndaktylie an den Zehen 1-3 betroffen. Die Syndaktylie kann komplett (knöcherne und häutige Verwachsung) oder inkomplett (nur häutige Verwachsungen) ausgebildet sein.

Die große Variabilität der Symptome, die sowohl inter- als auch intrafamiliär stark schwankt, erschwert die Diagnostik von GCPS. Außerdem können noch weitere Symptome wie erhöhtes Knochenalter, Hernien und ZNS-Fehlbildungen (z.B. Hydrozephalus, Hypoplasie/Agnesie des Corpus callosum, Marafie *et al.*, 1996) hinzukommen.

Die Identifikation von Translokationen t(3;7) (p21.1;p13) (Tommerup und Nielsen, 1983; Krüger *et al.*, 1989), t(6;7) (p27;p13) (Pelz *et al.*, 1986) und Mikrodeletionen (7p12.3-7p14.2), (7p11.2-7p13) (Wagner *et al.*, 1990) bei mehreren GCPS Patienten führte zur Lokalisierung des genetischen Ursprungs von GCPS auf Chromosom 7p13 (Brueton *et al.*, 1988; Pettigrew *et al.*, 1991). Als Kandidaten kamen mehrere Gene in Frage (*T Zellrezeptor-y*, *Interferon-β₂*, *EGFR* (epidermal growth factor receptor),

HOX 1.4 und *GLI3*) (Wagner *et al.*, 1990; Drabkin *et al.*, 1990). Untersuchungen von Vortkamp *et al.*, 1995 a) am Zentrum für Humangenetik im Marburg ergaben, dass das *GLI3*-Gen innerhalb des Chromosomenabschnittes lag, in dem die Translokationen und Deletionen von GCPS Fällen kartierten. Nach der Beschreibung der genomischen Struktur mit den endgültigen Exon-Intron-Grenzen wurden 1997 erstmals Punktmutationen im *GLI3*-Gen von GCPS Patienten nachgewiesen (Wild *et al.*, 1997).

2.3.3.2 Das Pallister-Hall-Syndrom

Das Pallister-Hall-Syndrom (PHS, MIM 146510) ist ein seltener, autosomal dominant vererbter Fehlbildungskomplex, der erstmals 1980 von Hall *et al.* beschrieben wurde. Das PHS umfaßt eine zentrale Polydaktylie und hypothalamische Hamartome kombiniert mit anderen Fehlbildungen. Die unten aufgeführten klinischen Kriterien fassen die Differentialdiagnose PHS zusammen:

1. **Hypothalamisches Hamartom:** Es handelt sich um eine tumorartige Fehlbildung der umgebenden Hirnsubstanz während der Embryonalentwicklung. Das Hamartom befindet sich in Höhe des dritten Ventrikels hinter dem Chiasma opticum. Die klinische Manifestation reicht von symptomlos bis zu neurologischen Ausfällen, z.B. in Form von Epilepsien.
2. **Zentrale Polydaktylie:** Zusätzliche gut ausgebildete Finger oder Zehen mit einem zusätzlichem oder y-förmigen Os metacarpale bzw. Os metarsale.
3. **Postaxiale Polydaktylie (PAP):** Hierbei kann es sich um einen zusätzlichen funktionstüchtigen Finger oder Zeh (PAP-A) bzw. lediglich um ein häutiges Anhängsel (PAP-B) handeln.
4. **Gespaltene Epiglottis:** Die Spaltung der Epiglottis betrifft mindestens 2/3 ihrer Fläche. Es handelt sich hier um ein sehr spezifisches Merkmal des PHS.
5. **Anusatresie, Nierenmissbildungen, ektope Uretermündung und Segmentationsstörungen der Lungen** sind fakultative zusätzliche Mißbildungen.

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Symptomen können endokrine Störungen wie Panhypopituitarismus vorhanden sein. Der Ausprägungsgrad der Erkrankung ist sehr unterschiedlich und variiert zwischen milder Ausprägung bis hin zu letalen Formen.

Die meisten Patienten sind aber nur leicht betroffen (Polydaktylie, asymptotisch gespaltene Epiglottis, hypothalamisches Hamartom).

Kuller *et al.* detektierten 1992 bei einem Patienten eine balancierte Translokation $t(3;7)(p25.3;q36)$. Danach kamen die Chromosomen 3 und 7 als Träger der genetischen Ursache für PHS in Frage. Durch Kopplungsanalysen konnte die Region 7p15-p13 als genetischer Ursprung der Erkrankung eingegrenzt werden (Kang *et al.*, 1997a). Die Detektion von Frameshift-Mutationen im *GLI3*-Gen bei zwei an PHS erkrankten Familien erlaubte schließlich die Identifikation von *GLI3* als krankheitsverursachendes Gen (Kang *et al.*, 1997b). Radhakrishna *et al.*, 1999 identifizierten außerdem eine Nonsense-Mutation im *GLI3* Gen in einer Familie mit PHS. Der autosomal-dominante Vererbungsmodus wurde erstmals von Topf *et al.* (1993) belegt.

2.3.3.3 Die Postaxiale Polydaktylie

Die Postaxiale Polydaktylie ist eine Fehlbildung, die als Symptom bei einigen rezessiven Fehlbildungssyndromen wie z.B. beim Bardet-Biedel (Diaz *et al.*, 1991-1992) oder Smith-Lemli-Opitz Syndrom vorkommt. Sie tritt aber auch isoliert als eigenständige Fehlbildung auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die isolierte Form der Postaxialen Polydaktylie (PAP; MIM 174200) untersucht. Die Prävalenz der PAP ist in der schwarzen Bevölkerung von Zentralafrika zehnmal höher als in einer kaukasischen Vergleichspopulation (Frazier, 1960). Die Postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A) (siehe 2.3.3.2) folgt einem autosomal dominanten Erbgang. Die beiden Varianten (PAP-A/B) finden sich sowohl isoliert als auch kombiniert an Händen und Füßen (Ventruto *et al.*, 1980). Kopplungsanalysen grenzten die Region 7p15-p11.23 für den Phänotyp PAP-A ein, wodurch *GLI3* als Kandidatengen in Frage kam (Radhakrishna *et al.*, 1997a). Die Detektion von Mutationen im *GLI3*-Gen bei Patienten mit PAP-A bestätigte schließlich *GLI3* als krankheitsverursachendes Gen (Radhakrishna *et al.*, 1997b).

2.3.3.4 Die Präaxiale Polydaktylie Typ IV

Die Präaxiale Polydaktylie Typ IV (PPD-IV; MIM 174700) folgt einem autosomal-dominanten Erbgang und ist durch Polydaktylien und Syndaktylien charakterisiert. Baraister *et al.*, 1983 zeigten im Vergleich mit dem GCPS-Syndrom (siehe 2.3.3.1), dass die Fehlbildungen der Finger der PPD-IV denen des GCPS entsprachen. Die klinische Diagnose der PPD-IV setzt sich aus den folgenden Merkmalen zusammen:

1. **Fehlbildungen der Hände:** Die Daumenduplikation fällt meist mild aus und wird manchmal nur in Form eines verbreiterten Daumens manifest. Syndaktylien unterschiedlicher Schweregrade finden sich an den Fingern 3 und 4.
2. **Fehlbildungen der Füße:** Die erste oder zweite Zehe ist verdoppelt (Polydaktylie). Syndaktylien kommen an allen Zehen vor.

1999 detektierten Radhakrishna *et al.* eine Frameshift-Mutation im *GLI3*-Gen eines Patienten mit PPD-IV und erweiterten dadurch das durch *GLI3*-Mutationen hervorgerufene Fehlbildungsspektrum um die PPD-IV.

In Tabelle 2.2 sind abschließend die mit dem *GLI3*-Gen-assoziierten Morphopathien und ihre klinischen Merkmale zusammenfassend dargestellt:

	GCPS	PHS	PAP-A/B	PPD-IV
Hypertelorismus	xx			
breite Stirn	xx			
Kraniosynostosis	x			
Hypothalamisches Hamartom		xxx		
präaxiale Polydaktylie	xxx			xxx
postaxiale Polydaktylie	xx	xx	xxx	
zentrale Polydaktylie		xxx		
kutane Syndaktylie	xxx			xx
ossäre Syndaktylie	xx	xx		xx
viscerale Anomalien		x		

GCPS (Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom), PHS (Pallister-Hall-Syndrom), PAP-A (Postaxiale Polydaktylie Typ A), PPD- IV (Präaxiale Polydaktylie Typ IV)

Tabelle 2.2: Zusammenfassung der klinischen Zeichen der *GLI3*-assoziierten Morphopathien

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor *GLI3* stellt das krankheitsverursachende Gen für die ähnlichen, aber doch unterschiedlichen Morphopathien GCPS, PHS, PPD-IV und PAP-A/B dar. Falluntersuchungen in den letzten Jahren zeigten, dass *GLI3*-Genveränderungen verantwortlich für die verschiedenen Phänotypen der genannten Morphopathien sind. Die Mutationen sind dabei unabhängig vom Phänotyp über das Gen verteilt, so dass keine offensichtliche Genotyp-Phänotyp Korrelation auszumachen ist (Kalff-Suske *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit soll die Fallzahlen der *GLI3*-assoziierten Morphopathien erhöht und so möglicherweise das Mutationsspektrum erweitert werden, um ein genaueres Bild der Verteilung der Mutationstypen innerhalb des *GLI3*-Gens zu erlangen. Dazu wurde die DNA von 24 Probanden mit klinisch diagnostiziertem GCPS, 4 Probanden mit klinisch diagnostiziertem PHS und 5 Probanden mit klinisch diagnostizierter PPD-IV untersucht. Außerdem wurde die DNA von insgesamt 5 weiteren Patienten mit verschiedenen isolierten und syndromalen Polydaktylien untersucht, die möglicherweise auch auf *GLI3*-Genveränderungen zurückzuführen sind.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien für Puffer und Lösungen in p.A. (*pro analysi*) Qualität von folgenden Firmen bezogen: Amersham (Braunschweig), Gibco BRL (USA), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze) und Roth (Karlsruhe).

40% Acrylamid	Pharmacia Biotech, Freiburg
2% Methylenbisacrylamid	Pharmacia Biotech, Freiburg
Agarose	GIBCO BRL, USA
Alconox	Aldrich, USA
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de-Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll (Typ 400)	Sigma, UK
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Riedel-de-Haen, Seelze
Long Ranger Gel Solution 50%	FMC, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
10x TBE-Puffer	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Wasser	
für Sequenzierung: HPLC	Mallinckrodt Baker, B.V.-Deventer, NL
für PCR, SSCA: Ampuwa	Fresenius, Oberursel
Xylenyanol	Merck, Darmstadt

3.1.2 Enzyme und Nukleotide

DNA-Größenstandard	MBI Fermentas, St. Leon, Rot
Proteinase K	Roche, Mannheim

3.1.3 Fertigsysteme

DyEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
'Ready-To-Go' PCR Beads	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden

3.1.4 Puffer und Lösungen

Ladepuffer für Agarosegele	15% Ficoll (w/v) 0,05% Xylenxyanol (w/v)
APS	10% Ammoniumpersulfat in H ₂ O (w/v)
Red-Cell-Lysis-Buffer (RCLB)	10 mM Tris 5 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl pH 7,6
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM Na ₂ EDTA pH 8,0
SSCA-Ladepuffer	20 mM EDTA 90% Formamid deionisiert (v/v) 0,05% Bromphenolblau (w/v) 0,05% Xylenxyanol (w/v) 9% Glycerin
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA pH 8,0
5x TBE-Puffer	5 M Tris-HCl 0,45 M Borsäure 100 mM EDTA pH 8,3

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
3.1.5 Geräte und Zubehör	
Autoklav	Gössner, Hamburg
Brutschrank Typ T 5050	Heraeus, München
DNA Sequenzierer, Modell 377A	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA/RNA Photometer Gene Quant II	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dokumentationssystem E.A.S.Y.RH-3	Herolab, St. Leon Rot
Elektrophoresenetzgeräte: EPS 500/400 ST 504 D	Pharmacia, Uppsala, Schweden Gibco BRL, USA
Gelelektrophoresesysteme: horizontal (verschiedene Modelle) vertikal (Hofer SE 600)	MWG-Biotech, Ebersberg Pharmacia Biotech, Freiburg
Magnetrührer Ikamag RO	Ikawerk, Staufen
pH-Meter	Wiss. Techn. Werkstätten, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen: Eppendorf Zentrifuge 5415C Sorvall RT 6000 Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg Du Pont, Dreieich
Thermocycler: Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, New Jersey, USA
TRIO Thermoblock TB	Biometra, Göttingen
Thermostat Metallblock Techne DB3	Techne, Frankreich
UV-Transluminator UVT2035 (302 nm)	Herolab, St. Leon Rot
Vortex Reax 2000	Heidolph, Hamburg
Waagen:	

Feinwaage Typ AE 240 Typ 2254	Mettler, Giessen/ Schweiz Sartorius, Göttingen
Wasserbäder: Typ 3042 Typ 1083 Typ F 10-CM 2219 Multitemp II	Köttermann, Hänigsen GFL, Münster Julabo, Seelbach LKB, Bromma, Schweden

3.2 Methoden

3.2.1 DNA

3.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte aus humanen Blutproben in Anlehnung an Standardprotokolle in den „Current Protocols in Human Genetics“ (Ausubel *et al.*, 1994).

Zunächst wurden in einem 50 ml Polypropylenröhrchen 10-20 ml EDTA-Blut mit 30-35 ml eiskaltem Erythrozyten-Lysepuffer (Red Cell Lysis Buffer; RCLB) gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Leukozyten wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge bei 4°C sedimentiert. Anschließend wurde das Leukozytensediment in 30 ml RCLB aufgenommen, gewaschen, und nach erneuter Zentrifugation (3000 rpm, 4°C) abschließend in 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 50 µl 10 mg/ml Proteinase K und 250 µl 10% SDS-Puffer wurden die Leukozyten über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln lysiert bis die Lösung aufgeklärt war.

Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 h wurde die Lösung mit 5 ml SE-Puffer versetzt und zur Vervollständigung des proteolytischen Abbaus ca. 5 min bei 55°C im Wasserbad geschüttelt. Zur Fällung von Proteinen aus der Lösung wurde 2,5 ml 5 M NaCl zugegeben. Durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 3000 rpm wurden die gefällten Proteine sedimentiert. Der Überstand, der die genomische DNA enthält, wurde in ein neues Polyethylenröhrchen überführt und mit 96% eiskaltem Ethanol auf ein Gesamtvolumen von 45 ml gebracht. Die gefällte DNA wurde mit einem Glashäkchen aufgenommen, in kaltem 70%igen Ethanol gewaschen und abschließend in 100-300 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

3.2.1.2 Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 lagert sich nicht-interkalierend an Nukleinsäuren an.

Mit DNA-Proben bekannter Konzentration wurde eine Eichkurve erstellt und die DNA-Konzentration der Proben in einer adäquaten Verdünnung (i.d.R. 1:50) im Vergleich zu diesen Standards fluorometrisch bestimmt.

Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde die DNA in einer Gebrauchskonzentration von 50 ng/μl in Aliquots abgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2 Standard Polymerase-Kettenreaktion (Ausubel *et al.*, 1994)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde von K. Mullis und Mitarbeitern der Firma Cetus in Kalifornien entwickelt (Mullis *et al.*, 1987). Sie findet u.a. bei der in-vitro-Anreicherung spezifischer DNA-Segmente Anwendung. Das Prinzip dieser in-vitro Genamplifizierung beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei aufeinanderfolgenden Schritten:

1. *Denaturierung der DNA*

Durch Erhitzen (94°C) werden DNA-Doppelstränge denaturiert. Die Einzelstränge dienen in der sich anschließenden Polymerasereaktion als Vorlage (Template).

2. *Primer-Anlagerung (Annealing)*

Zur Amplifizierung der DNA-Zielsequenz werden zwei Oligonukleotide aus ca. 20 Nukleotiden (Primer) benötigt. Durch die spezifische Bindung eines Primers an seine komplementäre Nukleotidsequenz im einzelsträngigen Template, wird das 5'-Ende des zu amplifizierenden Zielbereichs definiert. Der zweite Primer bindet entsprechend an das 3' Ende des Gegenstranges. Die zu amplifizierende Zielsequenz wird auf diese Weise von den Primern „eingerahmt“. Die spezifische Anlagerung der Primer an das Template erfolgt, je nach Basenzusammensetzung und Länge des Templat, in einem Temperaturbereich zwischen 55°C und 65°C. Eine hohe Primerkonzentration verhindert die Renaturierung der beiden DNA Einzelstränge.

3. *Kettenaufbau; Polymerase-Reaktion*

Die freien 3'-OH-Enden der beiden Primer dienen als Startstellen für die Synthese der komplementären DNA-Abschnitte entlang der beiden DNA-Einzelstränge. Dies geschieht durch Einbau von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) entlang des DNA-Template in 5'-3' Richtung. Die Polymerasereaktion wird durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase katalysiert, die aus dem Heißwasserbakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird. Diese sogenannte Taq-Polymerase bleibt bei einer Temperatur von 94°C (Denaturierung, siehe 1.) stabil. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 72°C, so dass durch Einstellung dieser Temperatur die Kettenaufbaureaktion effizient stattfinden kann.

Durch die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte läßt sich ein definierter DNA-Abschnitt exponentiell amplifizieren. Eine exponentielle Anhäufung des Amplifikates auf das bis zu 10⁷-fache ist unter optimalen Bedingungen möglich. Dabei dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge jeweils als Matrize für eine weitere DNA-Synthese.

3.2.2.1 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation genomischer *GLI3*-Fragmente wurden Ready-To-GoTM PCR Beads mit folgender Zusammensetzung in einem 25 µl Ansatz verwendet: 1,5 U Taq DNA-Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, je 200 µM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und BSA. Die Ansätze wurden wie folgt auf Eis zusammengestellt (Tabelle 3.1):

Reagenz	Volumen (Menge)
'Ready -To-Go' PCR-Beads	1 Einheit
DNA (50 ng/µl)	1 µl (50 ng)
Forward+Reverse-Primer-Mix (je 50 ng/µl)	1µl (je 50 ng)
Formamid	0 oder 1µl
aqua dest	ad 25 µl

Tabelle 3.1: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes

Durch stabile Sekundärstrukturen der DNA kann es während der PCR zu einer unspezifischen Amplifizierung kommen. Die Zugabe von Formamid führt zur Denaturierung dieser Sekundärstrukturen und kann sich dadurch spezifitätssteigernd auswirken.

Zur Amplifikation verschiedener Exon-Fragmente des *GLI3*-Gens wurden Bedingungen gewählt, die in vorausgegangenen Arbeiten optimiert worden waren (Wild *et al.*, 1997; Kalff-Suske *et al.*, 1999; Heuer, 2002). Dabei wurden Amplifikationsprodukte von weniger als 300 bp Länge angestrebt. Größere Exons sind deshalb durch mehrere sich überlappende Teilfragmente repräsentiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer finden sich im Anhang unter 8.1.

In Tabelle 3.2 wurden die, in dieser Arbeit verwendeten PCR-Bedingungen für alle untersuchten Exon-Fragmente bzw. Teilfragmente des *GLI3*-Gens zusammengefaßt.

Exon-Fragment	Anlagerungs-Temp.	Formamid	Zyklen	Exon-Fragment	Anlagerungs-Temp.	Formamid	Zyklen
Ex II-1	60 °C	-	32	Ex XIV-2	60°C	-	32
Ex II-2	66°C	-	32	Ex XIV-3	60°C	-	32
Ex III-1	61°C	-	32	Ex XV-1	60°C	+	32
Ex III-2	56°C	-	32	Ex XV-2	57°C	+	34
Ex IV	58°C	-	32	Ex XV-3	62°C	+	32
Ex V-1	61°C	-	32	Ex XV-4	65°C	+	32
Ex V-2	61°C	-	32	Ex XV-5	62°C	+	34
Ex VI	62°C	-	32	Ex XV-6	65°C	+	34
Ex VII-1	62°C	-	32	Ex XV-7	60°C	+	34
Ex VII-2	58°C	-	32	Ex XV-8	63°C	+	34
Ex VIII-1	62°C	-	32	Ex XV-9	64°C	+	33
Ex VIII-2	66°C	-	32	Ex XV-10	64°C	-	34
Ex IX	61°C	-	32	Ex XV-11	63°C	+	34
Ex X	56°C	-	32	Ex XV-12	58°C	+	34
Ex XI	51°C	+	34	Ex XV-13	63°C	+	34
Ex XII	59°C	-	32	Ex XV-14	68°C	-	32
Ex XIII-1	64°C	-	32	Ex XV-15	61°C	-	32
Ex XIII-2	65°C	-	32	Ex XV-16	61°C	-	32
Ex XIV-1	60°C	-	32	Ex XV-17	53°C	-	34

Tabelle 3.2: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der *GLI3*-Exon-Fragmente

Die Bedingungen für die DNA-Amplifizierung sind im folgenden Schema dargestellt:

• Initialdenaturierung	5 min bei 94°C	} 32-35 Zyklen
• Denaturierung	30 sec bei 94°C	
• Primer-Anlagerung	30 sec*	
• Elongation	30 sec bei 72°C	
• Abschließende Synthese	3 min bei 72°C	

*, Temperatur siehe Tabelle 3.2

Die PCR-Produkte wurden entweder bei -20°C aufbewahrt oder direkt analysiert.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Gelelektrophorese ist ein molekularbiologisches Verfahren, mit dem Nukleinsäurefragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Nukleinsäuren sind bei neutralem pH-Wert polyanionisch. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die DNA-Fragmente daher in Richtung Anode. Als Trennmaterial für DNA-Moleküle dient das Polysaccharid Agarose. Durch Wärmezufuhr gelöste Agarose polymerisiert beim Abkühlen zu einem Netzwerk, dessen Porengröße abhängig von der gewählten Agarosekonzentration ist. Die DNA bildet in der Agarose-Matrix größenspezifische Banden, die mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

3.2.3.1 Durchführung

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten der Größen 200-300 bp wurde eine Agarosekonzentration von 2% gewählt. Dazu wurden 5g Agarose in 250 ml 1xTAE durch Aufkochen gelöst, auf ca. 60°C abgekühlt, mit 0,025 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und vor der Polymerisation in eine Gelkammer gegossen. Die PCR-Produkte wurden in einem Verhältnis 5:1 mit Ladepuffer für Agarosegele (Ficoll) gemischt und bei einer Spannung von 50-150 V aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die anschließende Dokumentation des Agarosegels erfolgte unter UV-Licht (302 nm) mit dem Herolab E.A.S.Y. System (photographische Auswertung).

3.2.4 Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA)

3.2.4.1 Prinzip der Einzelstrang-Konformations-Analyse

(modifiziert nach Orita *et al.*, 1989)

Die Einzelstrang-Konformations-Analyse (single-stranded conformation analysis, SSCA) ist eine Methode zur Detektion von Sequenzveränderungen in einem bestimmten DNA-Abschnitt. Dieses Verfahren wurde 1989 erstmalig von Orita *et al.* beschrieben und hat sich seitdem, in Kombination mit einer nachgeschalteten Sequenzbestimmung, zur Identifikation von Mutationen bewährt.

Das Prinzip der SSCA Analyse liegt in der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit einzelsträngiger DNA in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), abhängig von ihrer Sekundärstruktur. Ein einziger Basenaustausch in einem DNA-Abschnitt kann dessen Sekundärstruktur und damit das Laufverhalten in der Gelelektrophorese verändern. Die Laufgeschwindigkeit dieses veränderten Einzelstranges unterscheidet sich dann im Vergleich zum Wildtyp. Das Anfärben des Polyacrylamidgels ergibt somit ein entsprechend verändertes Bandenmuster. Die SSCA Analyse von Genfragmenten ermöglicht außerdem die Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten Mutationen anhand eines charakteristischen DNA-Bandenmusters: liegt eine homozygote Mutation vor, zeigen, im Vergleich zum Wildtyp, beide Banden eine veränderte Laufgeschwindigkeit. Handelt es sich hingegen um eine heterozygote Mutation, verändert sich nur das Laufverhalten des von der Mutation betroffenen Allels.

Die Durchführung der SSCA umfaßt folgende Schritte:

- Amplifikation des zu untersuchenden Genabschnittes mittels PCR (siehe 3.2.2.1)
- Denaturierung der Proben zur Gewinnung einzelsträngiger DNA
- Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei definierter Stromstärke, Temperatur und Spannung
- Färbung des Polyacrylamidgels

Die Sensitivität der SSCA nimmt bei sehr großen (>400 bp) und sehr kleinen (<130 bp) DNA-Einzelsträngen ab, wobei die höchste Sensitivität bei Fragmenten mit etwa 200 bp erreicht wird (Sheffield *et al.*, 1993). Weiterhin ist die Sensitivität der SSCA

abhängig vom GC-Gehalt der Sequenz, von der Art und Lage einer Sequenzveränderung sowie von der unterschiedlichen Gelzusammensetzung und den Laufkonditionen der Elektrophorese.

3.2.4.2 Herstellung eines Polyacrylamidgels für die SSCA

Die Gelmatrix für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde aus gebrauchsfertigen Acrylamid (40%ig)- und Bisacrylamid-(2%ig)-Lösungen in einem 49:1 Verhältnis hergestellt. Für einen 50 ml Ansatz eines 12-%igen Polyacrylamidgels wurden folgende Lösungen in den in Tabelle 3.3 aufgeführten Volumina verwendet.

Lösung	Volumina
Acrylamid (40%)	15 ml
Bis-acrylamid (2%)	6 ml
10x TBE	5 ml
H ₂ O	ad 50 ml

Tabelle 3.3 : Zusammensetzung eines 12%-igen Polyacrylamidgels

Durch die Zugabe von 470 μ l Ammoniumpersulfat (APS, 10%) und 30 μ l Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurde die Polymerisation gestartet. Das Gemisch wurde umgehend zwischen zwei Glasplatten einer vertikalen Gelapparatur (Schichtdicke von 0,75 mm) gegossen und ein mit APS benetzter Kamm eingesetzt. Die Mindestpolymerisationszeit betrug 3 h.

3.2.4.3 Durchführung der Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 3,5 μ l PCR-Produkt (Tabelle 3.1) mit 8 μ l SSCA-Ladepuffer und 3,5 μ l Wasser gemischt und bei 95°C 5 Minuten lang denaturiert. Alle Proben wurden anschließend auf Eis gelagert, um das Renaturieren der DNA-Einzelstränge zu verhindern. Von jeder Probe wurden 7 μ l in die Taschen eines SSCA-Gels aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Einzelstränge erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einer vertikalen Gelelektrophorese-Kammer. Zur Erhöhung der Sensitivität der SSCA-Analyse, wurde die Auftrennung der Einzelstränge bei zwei unterschiedlichen Lauftemperaturen (10°C und 20°C) durchgeführt.

Folgende SSCA-Bedingungen wurden für alle *GLI3*-Exonfragmente eingehalten:

- 12% Polyacrylamidgel
- Lauftemperatur jeweils bei 10°C und 20°C
- 10 Minuten Vorlauf bei 200 V
- 1,5 Stunden Laufzeit bei 600 V

3.2.4.4 Färben des SSCA-Gels

Im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte eine Silberfärbung der SSCA-Gele. Diese wurde nach einem modifizierten Protokoll von Budowole *et al.* (1991) durchgeführt und umfasste folgende Schritte:

1. Entfernung der SSCA-Gele aus der SSCA-Apparatur und Fixierung für 5 min in 500 ml Ethanol (10%)/ Eisessig (0,5%)-Lösung.
2. Zur Oxidation wurde das Gel 10 min in 500 ml 1%iger Salpetersäure geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen.
3. Färbung für 20-30 min in 500ml einer 12 mM Silbernitratlösung (AgNO_3). Danach wurde das Gel gründlich mit Wasser gespült.
4. Die Reduktion des Silbers erfolgte in 1000 ml Entwicklerlösung (280 mM NaCO_3 -Lösung mit 0,019% Formaldehyd), die sofort nach Änderung ihrer Farbe ausgewechselt wurde.
5. Stoppen der Entwicklung mit Essigsäure (10%). Um ein Reißen des Gels zu vermeiden wurde der Lösung etwa 5% Glycerin zugefügt.

Anschließend wurden die Gele in Folien verpackt, in Rahmen aufgespannt und über Nacht getrocknet.

3.2.5 Isolierung von DNA aus Polyacrylamid -Gelen

Zeigte sich im SSCA-Gel ein vom Wildtyp abweichendes DNA-Bandenmuster, so wurde eine der aberranten Banden ausgestochen und mit 100 μl HPLC- H_2O überschichtet. Zum Ablösen der Folie erfolgte die Inkubation zunächst einige Stunden bei 4°C und anschließend über Nacht bei 37°C. Zur Reamplifikation des isolierten DNA-Abschnittes wurden 5-10 μl des Eluats für eine PCR-Reaktion

verwendet. Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers.

3.2.6 Sequenzierung

3.2.6.1 Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger

In dieser Arbeit wurde das enzymatische Sequenzierverfahren nach Sanger *et al.* (1977) wie folgt verwendet:

Eine in Einzelstrangkongformation vorliegende DNA dient als Matrize für eine DNA-abhängige DNA-Polymerase-Reaktion (DNA-Polymerase I). Außerdem ist hierfür ein Oligonukleotid notwendig („Sequenzierprimer“), das über seine komplementäre Sequenz an die einzelsträngige Matrizen-DNA bindet. Am 3'-Ende dieses Oligonukleotids beginnt die DNA-Polymerase mit der Synthese, in 5'-3' Richtung, einer Kopie des Templates. Das verwendete Nukleotidgemisch enthält neben den Desoxynukleotiden (dNTPs) auch basenspezifische Didesoxynukleotide (ddNTPs). Diesen Didesoxynukleotiden (ddNTPs) fehlt sowohl am 2'-Kohlenstoff, als auch am 3'-Kohlenstoff des Riboserestes eine Hydroxylgruppe, so dass keine Phosphodiesterbindung zur Polymerisierung der Nukleotide gebildet werden kann. Durch den Einbau dieser Didesoxynukleotide (ddNTPs) in den Nukleotidstrang erfolgt somit ein Abbruch der DNA-Synthese an dieser Stelle („Kettenabbruchmethode“). Das Verhältnis zwischen Desoxynukleotiden (dNTPs) und Didesoxynukleotiden (ddNTPs) wird so gewählt, dass es in statistischer Verteilung an jeweils einer der vielen Positionen, an denen dieses Nukleotid vorkommt, zum Abbruch der DNA-Synthese kommt. Die Reaktion erzeugt somit eine Serie von DNA-Abbruchfragmenten verschiedener Länge, die ein identisches durch den Sequenzierprimer festgelegtes 5'-Ende, jedoch unterschiedliche 3'-Enden, die durch das jeweilige ddNTP festgelegt sind, besitzen.

Die Reaktion verläuft unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase in mehreren Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und DNA-Synthese. Die so hergestellten DNA-Abbruchfragmente lassen sich in einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese größenspezifisch auftrennen. An die vier ddNTPs ist über einen Propyn-1-yl-Linkerarm je ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Diese vier Farbstoffe werden durch einen

Argonlaser bei jeweils spezifischer Wellenlängen (531 nm, 560 nm, 580 nm, 610 nm) zur Fluoreszenz angeregt. Da sich die Emissionsspektren dieser Farbstoffe teilweise überlagern, erfolgt die Auftrennung des emittierten Lichtes mit Hilfe von Filtern, die nur in einem kleinen Bereich der Emissionsmaxima durchlässig sind. Mit Hilfe eines Photomultipliers werden die emittierten Signale verstärkt, anschließend integriert und zur Datenauswertung in ein digitales Signal konvertiert. Durch die schrittweise Identifizierung der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide am 3'-Ende der jeweiligen DNA-Fragmente kann auf die Sequenz des Templates geschlossen werden.

3.2.6.2 Probenvorbereitung zur automatisierten Sequenzierung

Für diese Arbeit wurde der DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit verwendet. Darin enthalten sind die Thermo SequenaseTM II DNA-Polymerase, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, nichtmarkierte dNTPs und der benötigte Reaktionspuffer (siehe 3.2.6.1). Die ddNTPs sind mit verschiedenen Succinylfluoresceinen markiert: Die Fluorescein-Farbstoffe JOE (grün) für ddATP und FAM (blau) für ddGTP; die Rhodaminfarbstoffe TAMRA (gelb) für ddTTP und ROX (rot) für ddCTP (Smith *et al.*, 1985; 1986). Durch die relative Hitzestabilität der DNA-Polymerase (siehe 3.2.2) können die Reaktionen bei höheren Temperaturen ablaufen und somit ein Renaturieren der DNA Einzelstränge (Templates, siehe 3.2.6.1) verhindert werden.

Um für einen möglichst großen Bereich des isolierten DNA Abschnittes eindeutige Sequenzinformationen zu erhalten, wurden für jeden Abschnitt Forward und Reverse Primer eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden, getrennt für Forward- und Reverse-Primer (siehe 8.1), nach folgendem Schema zusammengestellt (Tabelle 3.4):

Reagenz	Volumen bzw. Menge
DNA	40 ng
Primer (Forward- oder Reverse-Primer)	3.2 pmol
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	4 µl
aqua dest	ad 10 µl

Tabelle 3.4: PCR-Ansätze für die automatisierte Sequenzierung

Die Amplifikation erfolgte in einem GENEamp 2400 Thermocycler (Perkin Elmer) unter folgenden Bedingungen:

- | | | | |
|--------|--------|---|------------------|
| ▪ 94°C | 2 min | } | 28 Zyklen |
| ▪ 94°C | 20 sec | | |
| ▪ AT* | 15 sec | | |
| ▪ 60°C | 1 min | | |
| ▪ 4°C | | | |

*Als Anlagerungstemperatur für die PCR wurde eine jeweils 2°C niedrigere als die in der Tabelle 3.2 angegebene Temperatur für das entsprechende PCR-Fragment gewählt.

Zum Entfernen nicht eingebauter Didesoxynukleotide (ddNTPs) wurde der Sequenzieransatz mit 10 µl HPLC, 2 µl Na-Acetat-EDTA-Puffer (1,5 M Na-Acetat; pH >8; 250 mM EDTA) und 80 µl Ethanol (95%) versetzt und gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die PCR-Produkte durch Zentrifugation 15 min bei 14000 rpm und 4°C pelletiert. Die DNA wurde mit 250-500 µl Ethanol (70%) gewaschen, zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4°C) und das DNA-Pellet an der Luft für 2-5 min getrocknet. Die Proben wurden bei -20°C gelagert oder sofort weiter verwendet. Zum Auftragen der DNA-Proben auf ein Sequenziergel wurde das Pellet in 4 µl Formamid-Ladepuffer aufgenommen, 2 min bei 94°C erhitzt und anschließend abgekühlt. Für die denaturierende PAGE wurden 3µl dieses Ansatzes verwendet.

3.2.6.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gele zur automatisierten Sequenzierung

Zur Auftrennung der amplifizierten und fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurde ein 6%iges Long-Ranger-Sequenzgel verwendet. Tabelle 3.5 stellt die hierfür notwendigen Lösungen bzw. Reagenzien zusammen:

Reagenzien	Volumen/ Menge
Long Ranger 29:1 (50%) Acrylamid-Lösung	5 ml
10x TBE	5 ml
H ₂ O (HPLC)	ad 50 ml
Harnstoff	18g

Tabelle 3.5: Reagenzien zur Herstellung eines 6%igen Sequenzgels

Das Gemisch wurde bei 50°C inkubiert und durch einen Faltenfilter (0,2 µm) filtriert. Durch die Zugabe von 250 µl 10% APS und 35 µl TEMED wurde die Polymerisation eingeleitet und das Reaktionsgemisch in eine Gelapparatur, mit 48 cm Auftrennlänge, zwischen zwei gereinigte Glasplatten (Schichtdicke 0,3 mm) gegossen. Die Polymerisationszeit betrug 2 Stunden. Die Glasplatten wurden anschließend in die Gelkammer des ABI-Sequencers 377 eingespannt. Nach Spülen der Lauffront mit Laufpuffer wurde ein 0,3 mm Sägezahnkamm mit 36 Zähnen eingesetzt. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 3 µl. Die Laufbedingungen sind in Tabelle 3.6 zusammengestellt:

Laufpuffer	1x TBE
Leistung	38 W
Spannung	2,5 kV
Stromstärke	50 mA
Laufzeit	3,5 h
Temperatur	51°C

Tabelle 3.6: Einstellungen des ABI-Sequencers 377

3.2.6.4 Auswertung der Sequenzanalysen

Zur Auswertung wurde die an den ABI PrismTM 377-96 Collection DNA Sequencer angegliederte Software der Version 2.6 der Data Collection und die Sequencing Analysis Software (Version 3.4.1) verwendet. Die Bearbeitung der Sequenzen erfolgte in MS Office 97 Power Point.

3.3 Patientenrekrutierung

In die Studie zur Mutationsanalyse des *GLI3*-Gens wurden Patienten mit Verdacht auf *Greig Cephalopolysyndakylie-Syndrom* (GCPS), *Pallister-Hall-Syndrom* (PHS), *Postaxiale Polydaktylie Typ A/B* (PAP-A/B) sowie *Präaxiale Polydaktylie Typ IV* (PPD-IV) aufgenommen. Zusätzlich wurde je ein Patient mit *radialer Polydaktylie* und Akromegalie aufgenommen. In der Regel wurden Anfragen auf Abklärung von *GLI3* als krankheitsverursachendes Gen von betreuenden Humangenetikern auf Wunsch von betroffenen Patienten oder Eltern mit betroffenen Kindern an das Institut für Humangenetik, Marburg gerichtet. Letzteres ist für *GLI3* in verschiedenen Listen für molekularbiologische Untersuchungen krankheitsverursachender Gene aufgeführt (Berufsverband für medizinische Genetik e.V. sowie Gene Tests in den USA [<http://www.genetests.org>]). Die klinische Symptomatik wurde anhand eines standardisierten Fragebogens erhoben, sofern die ursprüngliche Anfrage keine ausführlichen Informationen zum Krankheitsbild enthielt. Des Weiteren sollten angeforderte Karyotypanalysen größere, zytogenetisch sichtbare, Deletionen und Translokationen im Chromosomenabschnitt 7p13 ausschließen, um unnötige Punktmutationsanalysen zu vermeiden.

Sofern nicht bereits ein schriftliches Einverständnis, das die *GLI3* Mutationsanalyse einschließt, seitens des behandelnden Arztes eingeholt wurde, wurden den Patienten ein Aufklärungsblatt mit Informationen über die Studie und eine Einverständniserklärung vor Untersuchungsbeginn zur Unterzeichnung zugesandt. Zur Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen wurde 10-20 ml Blut der Patienten zur DNA-Gewinnung benötigt. In einigen Fällen stand auch Blut von nichtbetroffenen, bzw. betroffenen Familienmitgliedern zur Verfügung. Das Untersuchungsmaterial und die Auswertung personengebundener Daten wurde fortlaufend durch Identifikationsnummern verschlüsselt und gemäß dem gültigen Datenschutzgesetz gehandhabt. In der folgenden Tabelle (Tabelle 3.7) wird das Patientenkollektiv vorgestellt. Die Patienten und, falls vorhanden, verwandte Probanden werden einzeln aufgelistet. Die Diagnose bzw. Verdachtsdiagnose und fallspezifische Besonderheiten sind angegeben.

Code Nr. Proband	Diagnose	f/s	zusätzliche Fehlbildungen und Besonderheiten	Karyogramm	Herkunft der Proben
MR 2412	PHS	s	Ventrikelseptumdefekt	l.n.v.	Gent, Belgien
MR 2413	GCPS	f	Makrocephalie	l.n.v.	Gent, Belgien
MR 2414	GCPS	s	Makrocephalie	l.n.v.	Gent, Belgien
MR 2415	GCPS	f		l.n.v.	Gent, Belgien
MR 2416	GCPS	s	Partielle Agenesie des Corpus Callosum, Zahn-anomalien	l.n.v.	Gent, Belgien
MR 2417	PAP-A	f		l.n.v.	Gent, Belgien
MR 2418	GCPS	f		Normal	Charité, Berlin
MR 2423	GCPS	f	Makrocephalie, partiell doppelte Nierenanlage, doppelter Uterus	Normal	Uni Groningen, Niederlande
MR 2424	GCPS	/	Makrocephalie, Agenesie des Corpus	l.n.v.	Uni Leuven, Belgien
MR 2425	GCPS	/	Coronarnahtsynostose	l.n.v.	Uni, Würzburg
MR 2426	GCPS	/	Verdacht auf Morbus Pfeiffer, Coronarnahtsynostose	l.n.v.	Uni, Würzburg
MR 2435 MR 2434 V MR 2436 M	GCPS n.b. n.b.	s		Normal	Clinical genetics sevice, Victoria, Australien
MR 2438	GCPS	f		l.n.v.	Klin. Genetik, Nottingham
MR 2443 MR 2444 V MR 2445 M	GCPS n.b. n.b.	s		l.n.v.	Genetik, Oxford, England
MR 2122* MR 2441 V MR 2442 M	GCPS n.b. n.b.	/	Hypodontie	l.n.v.	W.v. Goethe Uni, Frankfurt
MR 2450	GCPS	s	Patientin mit 3. Spätabort in Folge	l.n.v.	W.v. Goethe Uni, Frankfurt
MR 2451 MR 2452 V MR 2453 M	GCPS n.b. n.b.	s		l.n.v.	Kinder-krankenhaus Altona, Hamburg
MR 2454	GCPS	/		l.n.v.	Uni, Leuven, Belgien
MR 2455	GCPS	f	Synpolydaktylien mit variabler Expression in der 3. Generation, Patientin aus der 2. Generation	l.n.v.	Uni, Leuven, Belgien
MR 2456	GCPS	f	Vater mit V. a. GCPS, DNA des Vaters ist angefordert	l.n.v.	RWTH, Aachen
MR 2461 MR 2462 M MR 2463 V	Poly-daktylie n.b. n.b.	s	Material: Fetus nach induziertem Abort	Normal	Human-genetik, Jerusalem, Israel
MR 2476	PP IV	/		l.n.v.	Uni, Genf

MR 2477	Akro- megalie	/		l.n.v.	Uni, Genf
MR 2478	GCPS	/		l.n.v.	Uni, Genf
MR 2479	GCPS	/		l.n.v.	Uni, Genf
MR 2481	PHS	/		l.n.v.	Uni, Genf
MR 2486	Rad. Poly- daktylie	/		l.n.v.	Uni, Genf
MR 2487	PP IV	/		l.n.v.	Uni, Genf
MR 2488	PP IV	/		l.n.v.	Uni, Genf
MR 2489	PP IV	/		l.n.v.	Uni, Genf
MR 2490	PP IV	/		l.n.v.	Uni, Genf
MR 2492 Z MR 2493 Z	post- axiale Poly- daktylie	s	V.a. auf Dysmorphie-Syndrom	l.n.v.	Klin. Genetik, Stuttgart
MR 2497 MR 2495 E MR 2494 T MR 2496 T	GCPS GCPS GCPS GCPS	f	3 Generationen mit GCPS	Normal	Uni, Aberdeen, Schottland
MR 2509	PHS	s	schwer betroffener Phänotyp	l.n.v.	Klin. Genetik, Charité Berlin
MR 2510 MR 2511 M MR 2512 V	GCPS n.b. n.b.	s		Normal	Uni, Lübeck
MR 2518 MR 2519 M MR 2520 V	PHS n.b. n.b.	f	Patient bereits im 1. Lebensjahr verstorben	l.n.v.	Charité, Berlin
MR 2521 MR 2522 V MR 2523 M	GCPS n.b. n.b.	s		l.n.v.	Pädiatrie, Olgahospital, Stuttgart
MR 2524	GCPS	f	Vater und Großvater mit Hexadaktylien der Fußzehen	l.n.v.	Uni, Gießen

Tabelle 3.7: Patientenkollektiv

Code Nr.= Identifikationsnummer der Patienten

f/s= familiäres bzw. sporadisches Auftreten des Krankheitsbildes

M= Mutter

V =Vater

T= Tochter von MR2497

E= Enkel von MR 2497 bzw, Sohn von MR 2494

Z= Zwillling

l.n.v.= liegt nicht vor

n.b.= nicht betroffenes Familienmitglied

*Proband MR 2122 wurde bereits im Rahmen einer vorherigen Mutationsanalyse teilweise untersucht und wurde hier zur Vervollständigung der Ergebnisse mitgeführt.

MR 2476-2490: Probanden mit den Identifikationsnummern MR 2476 bis 2490 wurden von der kollaborierenden Gruppe von Prof. S.E. Antonarakis (Medizinische Genetik, Universität Genf) zur *GLI*- Mutationsanalyse eingereicht.

4. Ergebnisse

4.1 Mutationsanalysen im *GLI3*-Gen bei Krankheitsbildern mit bekannter und unbekannter *GLI3*-Assoziation

Ziel dieser Arbeit ist es, das Mutationsspektrum des *GLI3*-Gens zu erweitern, um Aufschlüsse zur Phänotyp-Genotyp-Korrelation verschiedener *GLI3* assoziierter Morphopathien zu erhalten bzw. weitere *GLI3* assoziierte Krankheitsbilder zu erkennen. Insbesondere waren wir daran interessiert, Patienten mit *GLI3*-assoziierten Krankheitsbildern zu untersuchen, für die bislang keine nennenswerten Fallzahlen vorlagen:

- **PHS:** V671fsX691; V675fsX691 (Kang *et al.*, 1997 b)
E1147X (Radhakrishna *et al.*, 1999)
V 1002X (Kalf-Suske *et al.*, 2000)
- **PPD- IV:** E1216fsX1246 (Radhakrishna *et al.*, 1999)
- **PAP A/B:** V764fsX778 (Radhakrishna *et al.*, 1997)
R643X; G727R; L1236fsX1281 (Radhakrishna *et al.*, 1999)

Die Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA, siehe 3.2.4) hat sich als Methode zur Punktmutationssuche im *GLI3*-Gen bewährt und wurde auch in dieser Arbeit zur Aufdeckung von Basenaustauschen, kleineren Deletionen innerhalb von Exons und Insertionen im kodierenden Bereich und den direkt angrenzenden Intronbereichen eingesetzt. Der gesamte *GLI3*-Genbereich wurde zunächst in 38 Teilstücken aus genomischer DNA des Patienten amplifiziert (siehe 3.2.1, 3.2.2). Der Vergleich des Laufverhaltens dieser PCR-Produkte in der SSCA mit den Normalkontrollen ergab erste Hinweise auf Sequenzveränderungen (siehe 3.2.4).

Sofern Proben erkrankter oder nicht erkrankter Familienmitglieder zur Verfügung standen, wurde daraufhin deren entsprechendes Bandenmuster in einer zusätzlichen SSCA-Analyse mit der aberranten Bande des Patienten verglichen. Auf diese Weise ergaben sich zum einen Hinweise darauf, ob es sich bei der detektierten Veränderung um eine „de-novo-Veränderung“, d.h. eine in der Familie erstmalig auftretende Variation, oder um eine „vererbte Variation“ handelte. Zum anderen brachte dieser Vergleich erste Erkenntnisse über die Kausalität der Variante. Eine aberrante Bande, die ausschließlich bei betroffenen Familienmitgliedern detektiert wird, weist auf eine kausale Mutation im *GLI3*-Gen hin. Im Gegensatz dazu, bedeutet die Anwesenheit

einer aberranten Bande bei nicht betroffenen Familienmitgliedern, dass diese Veränderung nicht krankheitsverursachend ist, oder aber, dass es Abweichungen von der bislang angenommenen 100%igen Penetranz bei GLI3 Morphopathien gibt. Um außerdem ausschließen zu können, dass es sich bei dem Ergebnis um einen Polymorphismus handelt, wurden Kontrollanalysen mit DNA-Proben von 100 nicht betroffenen und nicht verwandten Probanden aus der deutschen Bevölkerung durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Sequenzanalyse zur Feststellung der Sequenzveränderung der vermuteten ursächlichen Mutation bzw. der polymorphen Variante (siehe 3.2.6). Dabei wurde sowohl eine direkte Heterozygotensequenzierung von PCR Produkten aus genomischer DNA sowie eine allelspezifische Sequenzanalyse mit PCR Produkten aus der DNA der isolierten aberranten SSCA-Bande durchgeführt. Die Heterozygotensequenzierung identifiziert eine Mutation aufgrund von Basenüberlagerungen, die durch die Präsenz einer heterozygoten Sequenz bedingt sind. Eine allelspezifische Sequenzanalyse zeigt hingegen erst im Vergleich mit einer Normalkontrolle die Sequenzveränderung. Die Vorstellung der Ergebnisse der molekularen Mutationsanalysen der insgesamt 38 Patienten erfolgt aufgrund der Zuordnung zu einer bereits bekannten klinisch diagnostizierten GLI3-Morphopathie (GCPS, PHS, PPD-IV) in drei Gruppen. Eine vierte Gruppe umfaßt unterschiedliche isolierte und syndromale Polydaktylien, deren Assoziation mit GLI3, bis auf den PAP-A Fall, ungeklärt ist. Diese Einteilung der Probanden (Code Nr.) ist in Tabelle 4.1- 4.4 wiedergegeben.

Tabelle 4.1: Gruppe I (n=24); Probanden mit klinisch diagnostiziertem GCPS

Code Nr. Proband	CodeNr. Familienmitglieder
MR 2122	
MR 2413	
MR 2414	
MR 2415	
MR 2416	
MR 2418	
MR 2423	
MR 2424	
MR 2425	
MR 2426	
MR 2435	MR 2434 M n.b. MR 2436 V n.b.

MR 2438	MR 2579 M b.
MR 2443	MR 2443 M n.b. MR 2444 V n.b.
MR 2450	
MR 2451	MR 2452 V n.b. MR 2453 M n.b.
MR 2454	
MR 2455	
MR 2456	
MR 2478	
MR 2479	
MR 2497	MR 2494 T V.a. GCPS MR 2495 E V.a. GCPS MR 2496 T V.a. GCPS
MR 2510	MR 2511 M n.b. MR 2512 Vn.b.
MR 2521	MR 2522 Vn.b. MR 2523 M n.b.
MR 2524	

Tabelle 4.2: Gruppe II (n=4); Probanden mit klinisch diagnostiziertem PHS

Code Nr. Proband	CodeNr. Familienmitglied
MR 2412	
MR 2481	
MR 2509	
MR 2518	MR 2519 M n.b. MR 2520 Vn.b.

Tabelle 4.3: Gruppe III (n=5); Probanden mit klinisch diagnostizierter PPD-IV

Code Nr. Proband	CodeNr. Familienmitglied
MR 2476	
MR 2487	
MR 2488	
MR 2489	
MR 2490	

Tabelle 4.4: Gruppe IV (n=5); Probanden mit verschiedenen isolierten syndromalen Polydaktylien

Code Nr. Proband	Diagnose	Code Nr. Familienmitglied
MR 2417	PAP-A	
MR 2461	Polydaktylie	MR 2462 M n.b. MR 2463 V n.b.
MR 2477	Acromegalie	
MR 2486	Radiale Polydaktylie	
MR 2492	Postaxiale Polydaktylie	MR 2493 Z betroffen

Legende für die Tabellen 4.1- 4.4:

Bei MR gefolgt von einer vierstelligen Zahl handelt es sich um die Identifikationsnummer der Probanden.

n.b.= nicht betroffenes Familienmitglied, b= betroffenes Familienmitglied

M= Mutter

V= Vater

T= Tochter von MR 2497

E= Enkel von MR 2497 bzw. Sohn von MR 2494

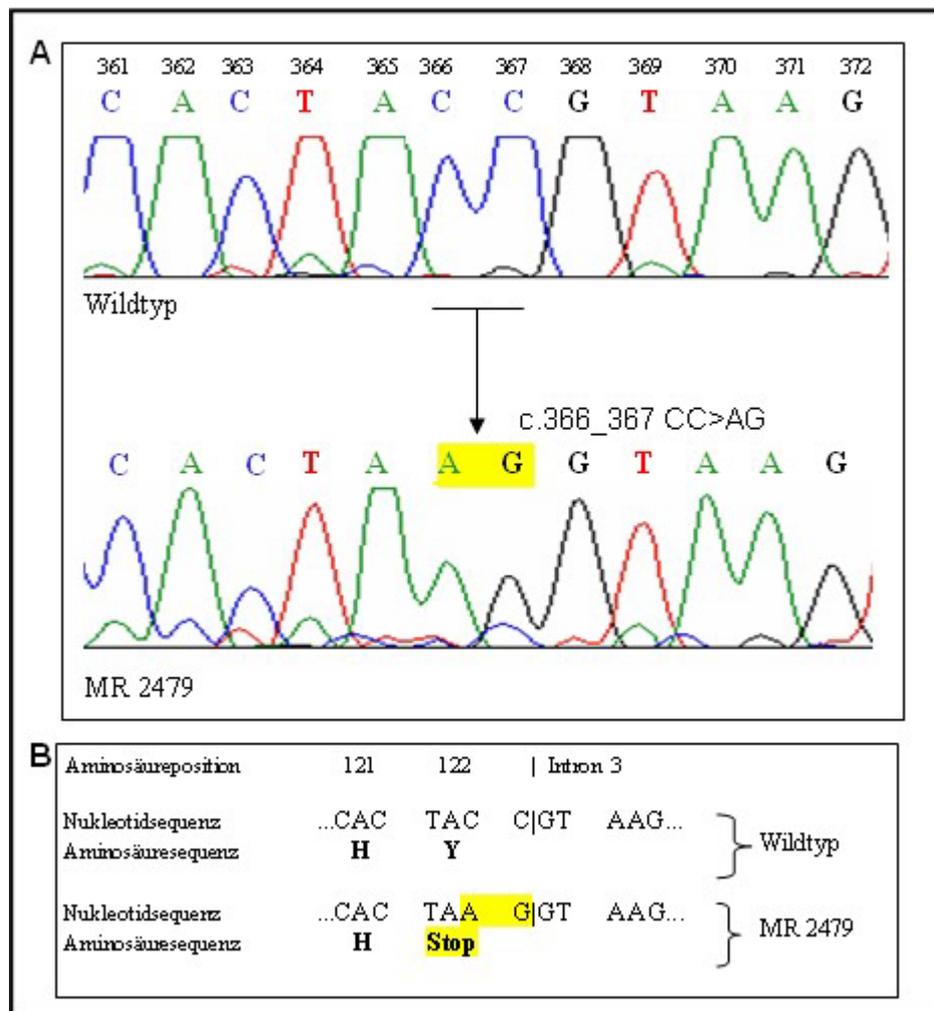
4.2 Mutationen im *GLI3*-Gen von GCPS-Patienten

Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalysen im *GLI3*-Gen führte bei insgesamt 24 Probanden mit klinisch diagnostiziertem oder Verdacht auf GCPS zur Identifikation von 12 Sequenzveränderungen, die aufgrund ihrer Frequenz in der Normalbevölkerung (< 1%) als möglicherweise ursächliche Mutationen betrachtet werden können. Die Sequenzierung der *GLI3*-Fragmente mit aberrantem Laufverhalten in der SSCA ergab 3 Nonsense-, 3 Missense-, 3 Spleißstellen- und 3 Frameshift-Mutationen (siehe 2.3.1).

4.2.1 Nonense-Mutationen bei GCPS-Patienten

Die Sequenzanalyse für Patient MR 2479 ergab einen Nukleotidaustausch an den Positionen 366-367 (c.366_367CC>AG) im Exonfragment **III-2b**. Der Dinukleotidaustausch CC>AG verändert das für die Aminosäure Tyrosin kodierende Nukleotidtriplett TAC in ein Stoppcodon TAA. Der dadurch bedingte Translationsstopp an Aminosäureposition 122 (Y122X) führt zu einem carboxyterminal verkürzten Protein (siehe Abbildung 4.1; Sequenzanalyse einer

Nonsense-Mutation). Diese Nonsense-Mutation liegt vor dem Zinkfinger-codierenden-Abschnitt des *GLI3*-Gens.



A: Die Abbildung zeigt die allelspezifische Sequenzanalyse des Patienten MR 2479 im Vergleich zur Wildtypsequenz im Bereich der Nukleotidposition 361-372. Patient MR 2479 zeigt einen Basenaustausch CC>AG an Position 366_367 der allelspezifischen Nukleotidsequenz.

B: Die Abbildung zeigt die Auswirkung der Nukleotidveränderung auf die Aminosäuresequenz. An Position 122 der Aminosäuresequenz des Patienten MR 2479 kommt es zu einem vorzeitigen Einbau eines Stoppcodons. Die Veränderungen in den Abbildungen A und B sind jeweils gelb unterlegt.

Abbildung 4.1: Sequenzanalyse einer Nonsense-Mutation

Bei Patient MR 2423 wurde der Austausch T>A an Position 485 (c.485T>A) im Exon-Fragment V-1 identifiziert. In Folge dieses Austausches entsteht an dieser Stelle ein vorzeitiges Stoppcodon, es kommt zum Translationsstopp an Position 162 der Aminosäuresequenz (L162X). Diese Nonsense-Mutation führt ebenfalls zu einem verkürzten Protein ohne Zinkfingerdomäne.

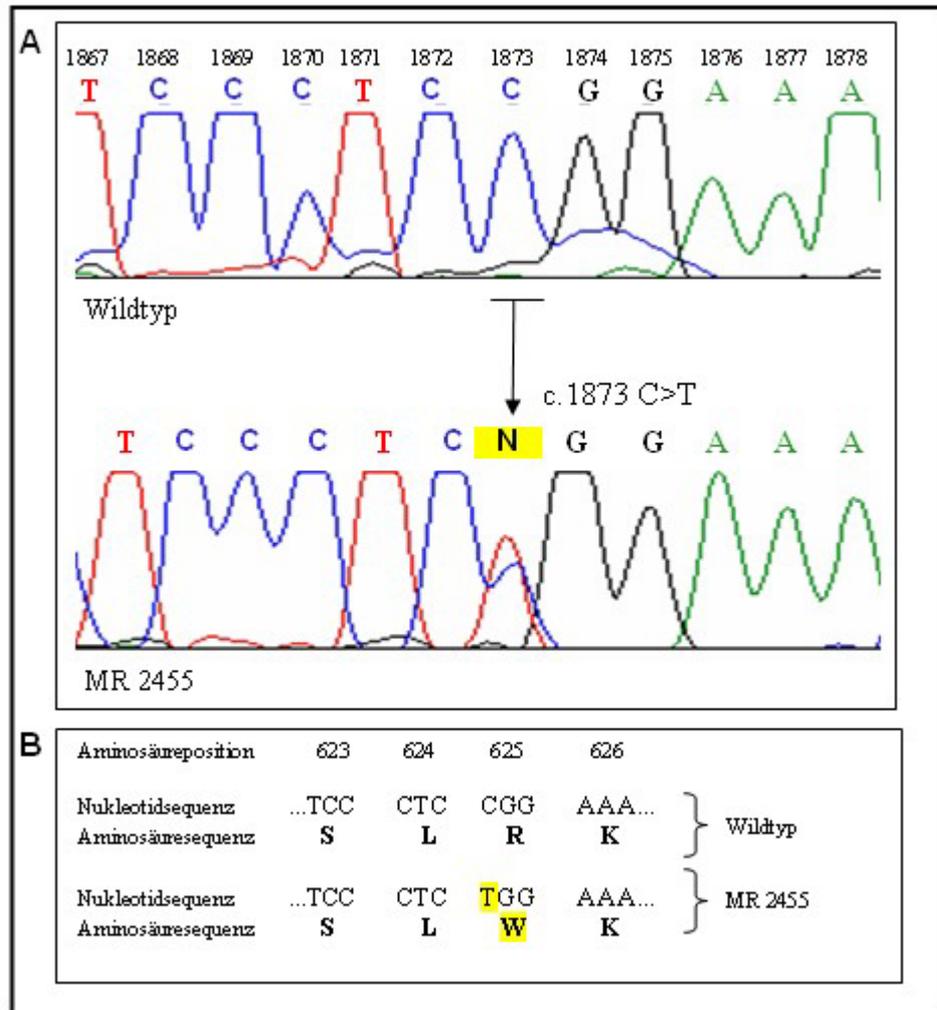
Eine T>G Transversion an Position 1109 der cDNA (c.1109T>G) im Exon-Fragment **VIII-1** bei Patient MR 2413 führt zu einem Stoppcodon (TGA), das einen vorzeitigen Abbruch der Translation an Aminosäureposition 370 (L370X) bedeutet. Das Proteinprodukt ist wiederum ein GLI3-Rest, dem die meisten funktionellen Domänen einschließlich der DNA-bindenden Region fehlen.

4.2.2 Missense-Mutationen bei GCPS-Patienten

Die Sequenzierung des Exon-Fragments **XII-1** des Patienten 2455 führte zur Identifikation des Nukleotidaustausches C>T an Position 1873 (c.1873C>T). Daraus resultiert die Substitution von Arginin durch Tryptophan an Aminosäure-Position 625 (R625W) (Abbildung 4.2; Sequenzanalyse einer Missense Mutation). Diese Mutation betrifft damit einen Bereich der Zinkfingerdomäne des GLI3-Proteins zwischen dem vierten und fünften Zinkfinger.

Patient MR 2122 weist an der Nukleotidposition 2119 im Exon-Fragment **XIV-1** einen C>T Austausch auf (c.2119C>T). Der daraus folgende Austausch eines Prolinrestes gegen einen Serin-Rest an Position 707 (P707S) betrifft die hochkonservierte Region 3 des GLI3-Proteins. Der nicht betroffene Vater des Patienten weist in der SSCA-Analyse des Exon-Fragmentes **XIV-1** die gleiche Veränderung auf, die unterhalb einer Frequenz von 1% in der Normalbevölkerung vorliegt.

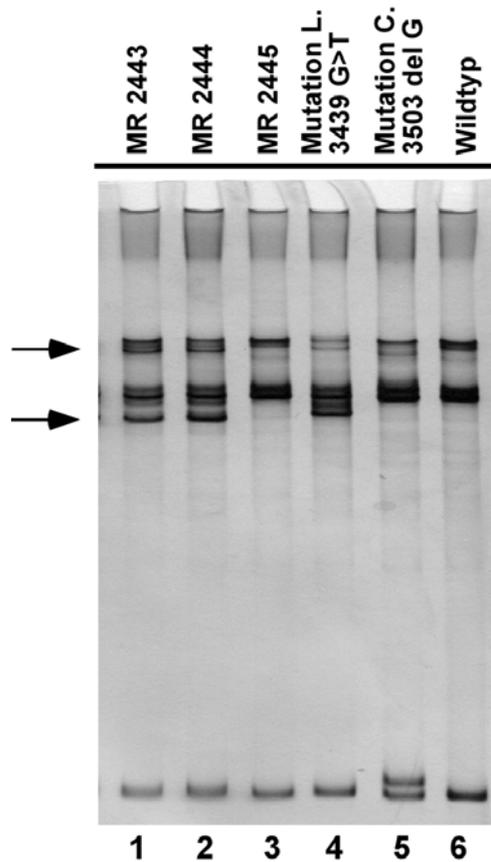
Bei Patient MR 2443 wurde eine Transition C>G an Position 3453 (c.3453C>G) im Exon-Fragment **XV-9** ermittelt. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes, führt dieser Nukleotidaustausch jedoch nicht zu einem Aminosäureaustausch im Protein (P1151P). Der nicht betroffene Vater (MR 2444) ist ebenfalls Träger dieser sogenannten stummen Mutation (siehe Abbildung 4.3).



A: Die Abbildung zeigt die Sequenzanalyse des Patienten MR 2455 im Vergleich zum Wildtyp im Bereich der Nukleotidsequenz 1867 bis 1878. An Position 1873 der heterozygoten Nukleotidsequenz zeigt sich beim Patienten MR 2455 ein Basenaustausch C>T.

B: Die Abbildung zeigt die Auswirkung der Nukleotidveränderung des Patienten MR 2455 auf die Aminosäuresequenz im Vergleich zum Wildtyp. An Position 625 der Aminosäuresequenz bewirkt die Nukleotidveränderung die Substitution von Arginin (R) zu Tryptophan (W). Die Veränderungen sind in den Abbildungen A und B jeweils gelb unterlegt.

Abbildung 4.2: Sequenzanalyse einer Missense-Mutation

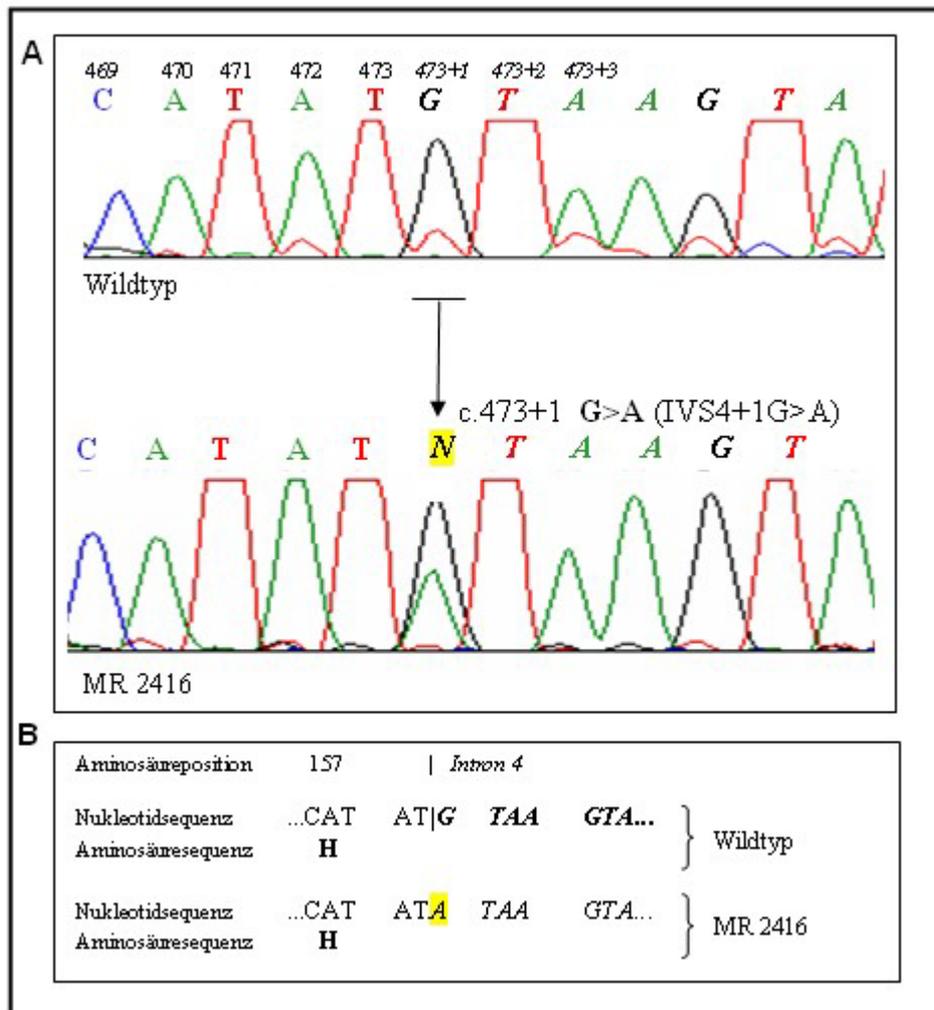


Die bei einer Lauftemperatur von 20°C durchgeführte SSCA-Analyse führte zur Identifikation der Missense-Mutation c.3453 C>G im Exon-Fragment XV-9 des *GLI3*-Gens des Patienten MR 2443 (Spur 1). Die in Spur 2 aufgetragene Probe des nicht betroffenen Vaters (MR 2444) von MR 2443 wies das gleiche veränderte Bandenmuster auf. Die Probe der Mutter (MR 2445, Spur 3) dagegen entspricht dem Bandenmuster der Wildtyp DNA in Spur 6. Spur 4 und Spur 5 enthalten Proben mit bekannten Mutationen, die zum Vergleich aufgetragen wurden. Die Pfeile markieren das aberrante Bandenmuster der Mutation c.3453 C>G.

Abbildung 4.3: SSCA-Analyse der Missense-Mutation c.3453 C>G

4.2.3 Spleißstellen-Mutationen bei GCPS-Patienten

Bei Patient MR 2416 konnte durch die Sequenzierung ein Basenaustausch an Position 473+1 (c.473+1G>A) im **Intron 4** detektiert werden. Dieser verändert das invariante GT der 5' Spleißstelle (siehe Abbildung 4.4; Sequenzanalyse einer Spleißstellen-Mutation), was aberrante Spleißvorgänge nach sich ziehen kann. Ein sogenanntes Exon-Skipping würde zu einer Deletion des vorausgegangenen Exons führen, die mit einer Leserasterverschiebung verbunden wäre. Dadurch entstünde an Position 215 der Aminosäuresequenz ein vorzeitiges Stoppcodon und damit vermutlich die Synthese eines stark verkürzten Proteins.



A: Die Abbildung zeigt die Sequenzanalyse im Bereich der Nukleotidsequenz 468 bis zu den Konsensussequenzen des Exon-Intron-Übergangs (in der Abbildung sind die Intronsequenzen kursiv dargestellt). Die Nukleotidsequenz des Patienten MR 2416 zeigt einen Basenaustausch G>A an Position 437 der heterozygoten Nukleotidsequenz im Vergleich zur Wildtypsequenz des entsprechenden Genabschnitts.

B: Die Abbildung zeigt die Auswirkung der Nukleotidveränderung auf die invariante Konsensussequenz des Introns (GT) dargestellt. Es kommt durch die veränderte Intron-Konsensussequenz zu einem veränderten Spleißmuster. Die Veränderungen sind in den Abbildungen A und B jeweils gelb unterlegt.

Abbildung 4.4: Sequenzanalyse einer Spleißstellenmutation

Die Nukleotidsequenz von Patient MR 2438 zeigte in der Sequenzierung eine Insertion von TA an den Nukleotidpositionen 1497 +4_5 (c.1497+4_5insTA) im **Intron 10**. Eine mögliche In-Frame-Deletion des vorangegangenen Exons X durch ein Exon-skipping würde zur Deletion der Zinkfingerdomäne 1 des GLI3-Proteins führen.

Patient MR 2415 wies an der Nukleotidposition 1647 +1_2 eine GT-Deletion (c.1647+1_2 delGT) innerhalb des **Introns 11** auf. Exon-Skipping würde zu einer In-

Frame-Deletion von Exon XI führen. In Folge dieses Szenarios wäre das GLI3-Protein durch den Verlust der dritten Zinkfingerdomäne betroffen.

Leider konnten für keine dieser Spleißmutationen, aufgrund fehlenden Untersuchungsmaterials (z.B. Fibroblastenkulturen der Patienten), die tatsächlich vorliegenden mRNA-Spezies ermittelt werden.

4.2.4 Frameshift-Mutationen bei GCPS-Patienten

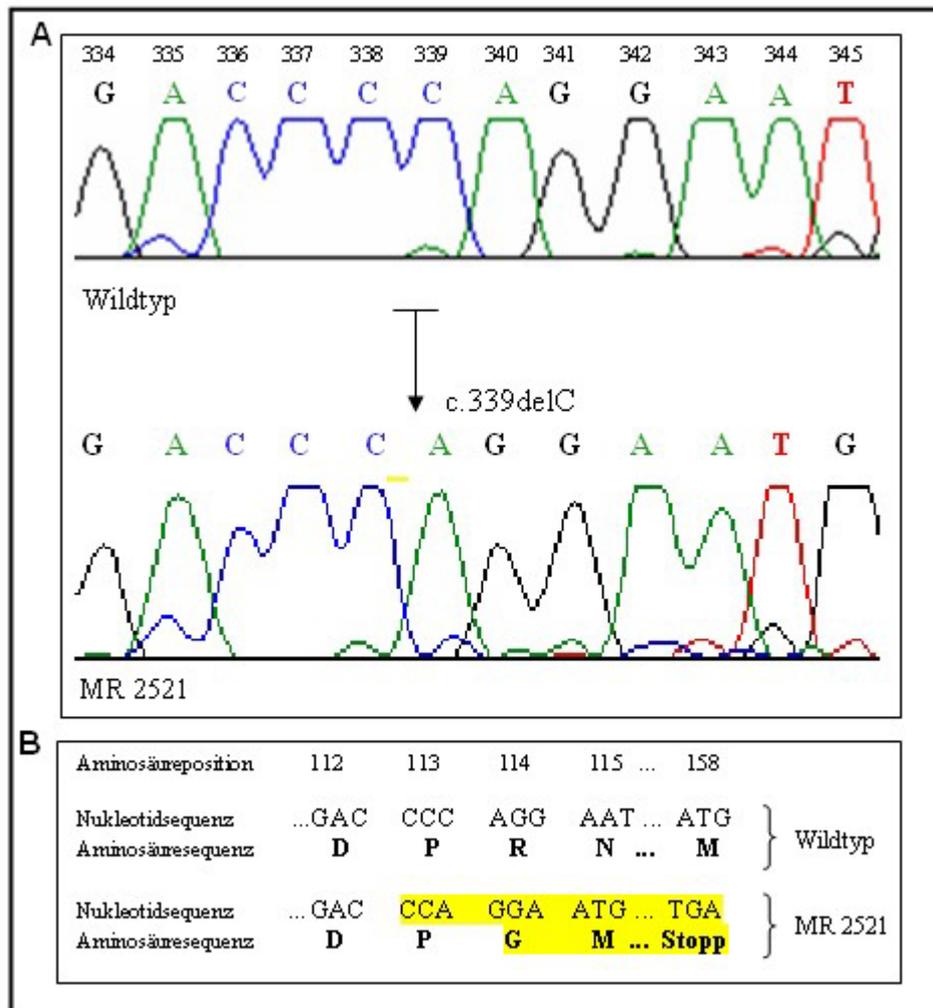
In der Analyse des Patienten MR 2521 wurde die Deletion eines Cytidin-Restes an Position 339 (c.339delC) im Exon-Fragment **III-2b** als Ursache für eine Leserasterverschiebung ermittelt. Während der Translation werden 44 zum Wildtyp veränderte Nukleotide eingebaut. An Position 158 der Aminosäuresequenz wird ein Stoppcodon gelesen und die Proteinbiosynthese beendet (R114fsX158) (siehe Abbildung 4.5; Sequenzanalyse einer Frameshift-Mutation) Das Stoppcodon liegt damit vor dem Zinkfinger-kodierenden Bereich des GLI3-Proteins.

Im Gegensatz zur Mutter (MR 2523) dieses Patienten, zeigte der Vater (MR 2522) in der SSCA-Analyse des Exons **III-2b** ein zur Wildtypkontrolle verändertes Bandenmuster. Der Vergleich mit dem spezifischen Bandenmuster der Mutation des Patienten MR 2521 und mit einem bereits bekannten Polymorphismus im *GLI3*-Fragment **III-2b** ergab, dass das aberrante Bandenmuster in der SSCA-Analyse des Vaters (MR 2522) durch einen Polymorphismus hervorgerufen wird. Die Mutation des Patienten MR 2521 ist somit eine kausale „*de-novo*“-Mutation (siehe 4.1).

Patient MR 2524 weist an der Nukleotidposition 3437-3453 des Exons **XV-9** eine Deletion von insgesamt 17 Nukleotiden (c.3437-3453del17) auf. Die daraus resultierende Leserasterverschiebung führt nach Einbau von 99 veränderten Aminosäuren an Position 1246 der Aminosäuresequenz zum Abbruch der Translation (L1146fsX1246). Der Einbau der veränderten Aminosäuren betrifft die Transaktivierungsdomäne TA₂ des GLI3-Proteins. Der vorzeitige Translationsstop kappt das Protein innerhalb dieser Transaktivierungsdomäne.

Bei Patient MR 2426 konnte an Position 4564-4565 des Exon-Fragments **XV-15** eine Insertion des Nukleotids Guanin identifiziert werden (c.4564_65insG). Dadurch kommt es auf Proteinebene zum Einbau von 12 veränderten Aminosäuren in das

Protein. An Position 1534 der Aminosäuresequenz endet die Translation durch die Umwandlung eines Serin-kodierenden Triplets (AGC) in ein Stopcodon (TAG) (A1522fsX1534). Das daraus resultierende Protein würde eine unvollständige Transaktivierungsdomäne TA₁ enthalten.



A: Die Abbildung zeigt das Ergebnis der DNA-Sequenzanalyse des Patienten MR 2521 mit der Basendeletion C an Position 339 der allelspezifischen Nukleotidsequenz im Vergleich zur Wildtypsequenz des entsprechenden Genabschnitts.

B: Die Abbildung zeigt die Auswirkung der Nukleotidveränderung auf die Nukleotidsequenz. Durch die Deletion auf Nukleotidebene kommt es zur Leserasterverschiebung und somit zum Einbau veränderter Aminosäuren auf Proteinebene. An Position 158 der Aminosäuresequenz kommt es zum vorzeitigen Translationsstopp. Die Veränderungen sind in den Abbildungen A und B jeweils gelb unterlegt.

Abbildung 4.5: Sequenzanalyse einer Frameshift-Mutation

4.3 Mutationen bei Patienten mit klinisch diagnostiziertem PHS

Es standen Proben von 4 Patienten zur Verfügung (siehe Tabelle 4.2). In zwei Fällen konnten Mutationen im *GLI3*-Gen ermittelt werden.

Bei Patient MR 2481 wurde an Position 1871 im Exon-Fragment **XII-1** eine Missense-Mutation identifiziert. Der Austausch der Basen Thymin gegen Cytosin an dieser Position (c.1871T>C) führt während der Translation an Position 624 der Aminosäuresequenz zum Austausch eines Leucinrestes gegen einen Prolinrest (L624P). Die Mutation betrifft somit die sogenannte Histidin-Cystidin Verbindung („H-C Link“) zwischen dem vierten und fünften Zinkfinger des *GLI3*-Proteins. Leider war es nicht möglich die Kausalität dieser Missense-Mutation für den PHS Phänotyp durch Analyse von Eltern Proben zu erhärten bzw. zu widerlegen. Dies ist um so beklagenswerter, da bislang ausschließlich Mutationen, die ein vorzeitiges Stoppcodon einführen für den PHS Phänotyp in der Literatur beschrieben sind.

Bei Patient MR 2509 kommt es durch die Deletion eines Nukleotids (Thymidin) ab Position 2935 im Exon **XV-5** zu einer Leserasterverschiebung (c.2935delT). Es kommt zum Einbau von 23 veränderten Aminosäuren in die Proteinsequenz und einem vorzeitigen Translations-stopp an Position 1002 der Aminosäuresequenz (C979fsX1002).

4.4 Mutationen bei Patienten mit klinisch diagnostizierter PPD-IV

Unter den 5 untersuchten Patienten mit klinisch diagnostizierter PPD-IV konnte bei zwei Patienten eine Mutation identifiziert werden.

Patient MR 2488 zeigte in der Sequenzierung des Exon-Fragments **XV-2** an Position 2594 einen Austausch von Cytosin gegen Adenin (c.2594C>A). In Folge dieses Basenaustausches entsteht im Exon Fragment **XV-2** an Position 2594 ein Stoppcodon (S865X), so dass die Proteinbiosynthese C-terminal zum Zinkfinger abbricht.

Bei Patient MR 2487 konnte eine Leserasterverschiebung nach Insertion eines Adenosinrestes an Position 3455-3456 der Nukleotidsequenz (c.3455_3456insA) im

Exon **XV-9** durch die Sequenzierung identifiziert werden. Der vorzeitige Kettenabbruch kappt das GLI3-Protein innerhalb der Transaktivierungsdomäne TA₂ an Aminosäureposition 1246 (E1152fsX1246).

4.5 Ergebnisse der GLI3 Mutationsanalyse in der Patientengruppe mit verschiedenen isolierten und syndromalen Polydaktylien

In dieser heterogenen Patientengruppe (siehe Tab. 4.4) konnte nur bei einem Fall eine Mutation ermittelt werden. Die Untersuchung des Abortmaterials (MR 2461) zeigte einen Austausch, G>A an Position 1647+13 im **Intron 11**. Die Sequenzveränderung liegt zwar relativ nahe der 5'-Spleißstelle aber in einem nicht konservierten Bereich so dass kein offensichtlicher Grund für eine Spleißstörung vorliegt. Außerdem zeigte der nicht betroffene Vater von MR 2461 (MR 2463) in der SSCA-Analyse des Intron 11 ein identisches aberrantes Bandenmuster. Eine Kausalität zwischen dieser Sequenzveränderung im **Intron 11** des *GLI3*-Gens von Patient MR 2461 und dem Phänotyp (Polydaktylie) ist demnach nicht zu vermuten. *GLI3-Mutationen* konnten also weder bei dem Patienten mit der bekannten GLI3 Morphopathie (PAP-A), noch bei bislang nicht assoziierten Krankheitsbildern nachgewiesen werden.

4.6 Zusammenfassung der identifizierten *GLI3*-Mutationen bei Patientengruppen mit *GLI3*-assoziierten Krankheitsbildern

Die Ergebnisse der Mutationssuche im *GLI3*-Gen sind in Tabelle 4.5 zusammengestellt.

Mutationstyp	Veränderung der Nukleotidsequenz	Auswirkung auf Proteinebene	Position im <i>GLI3</i> -Protein	Code Nr. Proband
Patientengruppe mit klinisch diagnostiziertem GCPS				
Nonsense	c.366 367CC>AG	Y122X	N-Terminus	MR 2479
Nonsense	c.485T>A	L162X	N-Terminus	MR 2423
Nonsense	c.1109T>G	L370X	N-Terminus	MR 2413
Spleißstellen-Mutation	c.473 +1G>A (IVS4+1G>A)	möglicherweise Exon- skipping IV	N-Terminus	MR 2416
Spleißstellen-Mutation	c.1497 +4_5insTA (IVS10+4_5insTA)	möglicherweise Exon- skipping X	ZFD	MR 2438
Spleißstellen-Mutation	c.1647 +1_2delGT (IVS11+1_2delGT)	möglicherweise Exon- skipping XI	ZFD	MR 2415
Missense	c.1873C>T	R625W	ZFD	MR 2455
Missense	c.2119C>T	P707S	Domäne 3	MR 2122
Missense	c.3453C>G	P1151P	/	MR 2443
Frameshift	c.339delC	R114fsX158	N-Terminus	MR 2521
Frameshift	c.3437 3453del17	L1146fsX1246	TA ₂	MR 2524
Frameshift	c.4564 65insG	A1522fsX1534	TA ₁	MR 2426
Patientengruppe mit klinisch diagnostiziertem PHS				
Missense	c.1871T>C	L624P	ZFD	MR 2481
Frameshift	c.2935delT	C979fsX1002	C-Terminus	MR 2509
Patientengruppe mit klinisch diagnostizierter PP IV				
Nonsense	c.2594C>A	S865X	Domäne 4	MR 2488
Frameshift	c.3455-3456ins A	E1152fs1246X	TA ₂	MR 2487

In der Tabelle sind alle identifizierten Mutationen im kodierenden Bereich des *GLI3*-Gens aufgelistet. In den entsprechenden Spalten sind der Mutationstyp, die Position der Mutation in der cDNA-Sequenz und die Auswirkung auf Aminosäureebene bzw. RNA-Ebene dargestellt (Nomenklatur nach den Dunnen und Antonarakis, 2000, Hum. Mut.15: 7-12).

Die vierte Spalte gibt die Position der Veränderung bzw. den Abbruch der Proteinsynthese im *GLI3*-Protein an.

ZFD= Zinkfingerdomäne

TA= Transaktivierungsdomäne

Tabelle 4.5: Identifizierte *GLI3*-Mutationen bei verschiedenen *GLI3*-assoziierten Krankheitsbildern

	GCPS	PHS	PP IV	PAP-A
n	24	4	5	1
M	10	1-2*	2	0
n/M *100	<u>42 %</u>	<u>25-50 %</u>	<u>40 %</u>	<u>0%</u>

n= Anzahl der untersuchten Patienten; M= Anzahl der gefundenen kausalen Mutationen; n/M*100= prozentualer Anteil der Mutationen

*Die niedrigere Detektionsrate gilt, falls die Kausalität der L624P-Missensemutation nicht nachgewiesen werden kann. Die Ursachen für die generell unter 50% liegenden Mutationsraten werden ausführlich in der Diskussion behandelt.

Tabelle 4.6: Tabellarische Erfassung der beobachteten Mutationen

4.7 Polymorphismen

Die SSCA-Analyse der Exon-Fragmente **III-1, V-1, V-2, VII-1, IX, XI, XV-4, XV-5, XV-6, XV-7, XV-12, XV-16 und XV-17** ergab für einige Patienten abweichende Bandenmuster, die durch den Vergleich mit 100 gesunden Kontrollpersonen als Polymorphismen identifiziert wurden. Im Schnitt werden mindestens 1.4 *GLI3*-Polymorphismen im codierenden Bereich im diploidem Genom beschrieben.

Einige dieser Polymorphismen waren durch vorangegangene Arbeiten bereits bekannt. In einem Fall konnte jedoch ein bisher noch nicht beschriebener Polymorphismus identifiziert werden: Im Fragment **XV-12** zeigte sich ein aberrantes Bandenmuster, welches sich auch in 2 von 100 Kontrollpersonen zeigte. Die anschließende Sequenzierung ergab einen Nukleotidaustausch C>T an Position 3987 (c.3987C>T). Das neu entstandene Triplet GGT codiert genau wie das ursprüngliche Triplet GGC für die Aminosäure Glycin (G1329G), die Proteinstruktur bleibt also unverändert.

Tabelle 4.7 faßt alle Polymorphismen der Patientengruppen zusammen. Durchweg handelt es sich um Aminosäureaustausche und Veränderungen in Bereichen außerhalb der bekannten Konsensussequenzen.

Exon Fragment	Veränderung der Nukleotidsequenz	Auswirkung auf die Aminosäuresequenz	Code Nr. Proband	SSCA-Bedingungen	Frequenz
III-2	c.341C>A	R114K	MR 2522 n.b.V.	10°C u. 20°C	3%
V-1	*	*	*		
V-2	*	*	*		
VII-1	c.900C>T	S300S	MR 2417 MR 2425 MR 2426 MR 2461 MR 2477 MR 2478 MR 2489	10°C u. 20°C 10°C 10°C 10°C 10°C 10°C 10°C	11%
IX	c.1356 +11C>G	Intron	MR 2518 MR 2521	10°C u. 20°C 10°C u. 20°C	7%
XI	c.1509C>T	N503N	MR 2426	10°C u. 20°C?	14%
XV-4	c.2826G>C	P942P	MR 2426 MR 2492 MR 2509	10°C u. 20 °C 10°C u. 20 °C 10°C u. 20 °C	14%
XV-5	**	**	**		
XV-6	**	**	**		
XV-7	c.3083-84GC>TT	S1028I	MR 2412 MR 2423 MR 2496 MR 2497	20°C 20°C 10°C u. 20°C 10°C u. 20 °C	
XV-12	c.4020C>T	P1340P	MR 2426	10 °C u. 20°C	16%
	c.4007G>A	G1336E	MR 2426	10°C u. 20°C	13%
	c.3987C>T	G1329G	MR 2122 MR 2441	10°C u. 20°C	2%
XV-16	c.4609C>T	R1537C	MR 2492 MR 2493 MR 2509	10°C u. 20°C	12%
XV-17	c. 4879T>A (untranslatierter Bereich)	L1627I	MR 2492 MR 2493 MR 2509	10°C u. 20°C	15%
	c. 4773G>T	R1591R	MR 2426 MR 2492 MR 2509	10°C u. 20°C	15%

In den entsprechenden Spalten sind das Exon-Fragment mit der Position des Nukleotidaustausches in der cDNA-Sequenz und die Auswirkung auf die Aminosäuresequenz dargestellt (Nomenklatur nach den Dunnen und Antonarakis, 2000). In den letzten beiden Spalten sind die SSCA-Bedingungen angegeben, unter denen die aberranten Banden beobachtet wurden, sowie die Frequenz der Polymorphismen in der Normalpopulation.

* Bei den Bandenmustern in Exon V-1 und V-2 handelt es sich um Kombinationen von Allelen mit folgenden Polymorphismen in der Region (unveröffentlichte Daten D. Bornholdt September 2000):

- c.557G>A, A183T
- c.537C>T, P179H
- c.539G>A, R180Q

** Bei den Bandenmustern in Exon XV-5 und XV-6 handelt es sich um Kombinationen von Allelen mit folgenden Polymorphismen in der Region (unveröffentlichte Daten D. Bornholdt September 2000):

- c.2993T>C, L998P
- c.3083-84GC>TT, S1028I
- c.3001G>A, G1001S

n.b.= nicht betroffen

V= Vater

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der identifizierten Polymorphismen des gesamten Patientenkollektivs

5. Diskussion

5.1 *GLI*-Gene während der Extremitätenentwicklung und assoziierte Krankheitsbilder

Für die Ausbildung der Extremitäten ist eine Vielzahl von Genen verantwortlich, die jeweils bestimmte Schritte während der Entwicklung steuern und in ihrer Aktivität interagieren. Dies ermöglicht das zeitlich koordinierte Wachstum der Extremität in die proximo-distale, anterior-posteriore und dorso-ventrale Richtung (Riddle and Tabin, 1999) (siehe 2.1.1).

Eine Schlüsselrolle in der Entstehung der anterior-posterioren Polarität der Extremitäten spielt die Sonic Hedgehog-Patched-GLI (SHH-PTCHH-GLI) Signalkaskade. An diesem Signalweg sind, neben einigen anderen Proteinen, die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3, beteiligt (Ruiz i Altaba, 1997; 1999) (siehe 2.2.1). Eine inzwischen beträchtliche Anzahl an Erkrankungen, die mit der HEDGEHOG-Kaskade in Zusammenhang gebracht wurden, werden auch als HEDGEHOG-Signal-assoziierte Erkrankungen (HSDs) zusammengefaßt (Ruiz i Altaba, 1999). Diese können, abhängig vom betroffenen Mitglied der Hedgehog Signalkaskade, sehr unterschiedlich in ihrer Ausprägung sein (siehe Tabelle 2.1; Kapitel 2.2.1). Trotz der zum Teil sehr heterogenen Syndrome und Symptome, die mit den HSDs assoziiert sind, deuten viele der entwicklungsbedingten Fehlbildungen auf einen gemeinsamen Ursprung in der Hedgehog-Kaskade hin (Ruiz i Altaba, 1999; Villavicencio *et al.*, 2000; Kelley, 2000). Verschiedene Formen von Gliedmaßenfehlbildungen sind den HSDs gemeinsam und deuten auf eine Störung der anterior-posterioren Achsenbildung hin.

Das humane *GLI1* ist auf Chromosom 12q13 lokalisiert und wurde aufgrund seiner Amplifikation in bestimmten Gliomen als Onkogen klassifiziert (Ruppert *et al.*, 1991). Dem GLI2-Transkriptionsfaktor, der auf Chromosom 2q14 kodiert ist, konnte bisher noch keine Gliedmaßenstörung zugeordnet werden. Dagegen werden Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz für GLI3 mit vier verschiedenen, in ihrer Ausprägung sehr unterschiedlichen Fehlbildungen assoziiert: dem Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom (GCPS, OMIM 175700), dem Pallister-Hall-Syndrom (PHS, OMIM 146510), der Präaxialen Polydaktylie Typ IV (PPD-IV, OMIM 174700) und der Postaxialen Polydaktylie Typ A (PAP-A, eine Form der

Postaxialen Polydaktylie, OMIM 174200). All diesen mit *GLI3*-assoziierten Erkrankungen sind Gliedmaßenfehlbildungen gemeinsam.

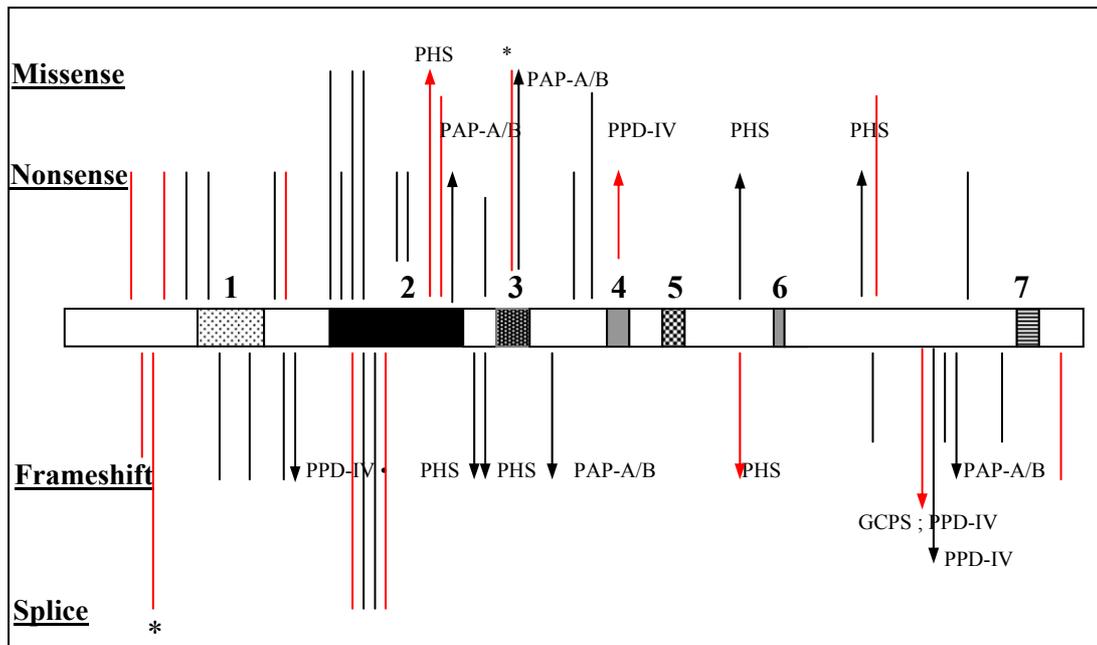
5.2 Mutationen im *GLI3*-Gen und deren mögliche Auswirkung auf die Funktion des Proteins

Der Transkriptionsfaktor *GLI3* stellt das Kandidatengen für die unterschiedlichen Morphopathien GCPS, PHS, PPD-IV und PAP-A/B dar (siehe 2.3.2). Neben großen chromosomalen Veränderungen, wie Translokationen und Deletionen, sind auch Punktmutationen im *GLI3*-Gen als Ursache der beobachteten Fehlbildungen beschrieben worden.

In dieser Arbeit konnten zu den bereits bekannten Mutationen im *GLI3*-Gen 16 weitere Mutationen bei GCPS-, PHS- und PPD-IV-Patienten identifiziert werden. Mutationen im gleichen Protein sind in der Lage zu unterschiedlichen Fehlbildungen zu führen. In Abbildung 5.1 sind alle bisher bekannten Mutationen des *GLI3*-Transkriptionsfaktors mit den entsprechenden Phänotypen zusammengefaßt. Die in dieser Arbeit identifizierten Mutationen sind rot hervorgehoben.

Die Hypothese, GCPS sei durch Mutationen verursacht, die den Verlust der DNA-bindenden Domäne auslösen, PAP-A durch Mutationen, die carboxyterminal der hochkonservierten Region 3 und PHS durch Mutationen, die zwischen der ZFD und Region 3 zu einem verkürzten Protein führen (Biesecker, 1997), konnte nicht bestätigt werden (Radhakrisna *et al.*, 1999).

Bei den im *GLI3*-Locus identifizierten Punktmutationen handelt es sich überwiegend um Nonsense- und Frameshift-Mutationen. Diese führen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und damit zu einem carboxyterminal verkürzten Protein. Da die Funktion des verkürzten Proteins eingeschränkt bzw. verloren ist, kommt es zur Halbierung der Gendosis (Haploinsuffizienz). Damit steht nur die Hälfte der ursprünglichen Proteinmenge zur Verfügung, was als Ursache für die phänotypische Ausprägung der Erkrankung angesehen wird.



Die Abbildung zeigt alle bisher veröffentlichten, sowie eine mit • gekennzeichnete, noch nicht veröffentlichte *GLI3*-Mutation, bei Patienten mit *GLI3*-assoziierten Morphopathien. Die Art der Mutation ist auf der linken Seite bezeichnet. Die Mutationen der GCPS-Fälle sind durch Balken markiert, während die Mutationen der PHS-, der PPD-IV und der PAP A/B-Fälle durch Pfeile gekennzeichnet sind. Die in dieser Arbeit detektierten Mutationen sind farblich rot hervorgehoben. Mutationen, die mit * gekennzeichnet sind, entsprechen bereits veröffentlichten Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit erneut, bei anderen Patienten detektiert. Das *GLI3*-Protein ist schematisch dargestellt.

Splice= Spleißstellenmutation

Abbildung 5.1 : Übersicht der bisher veröffentlichten und der neu detektierten *GLI3*-Mutationen bei Patienten mit *GLI3*-assoziierten Morphopathien

Missense-Mutationen hingegen, die ebenfalls im Zusammenhang mit GCPS und im Rahmen dieser Arbeit erstmals auch mit auch mit PHS im *GLI3*-Locus detektiert wurden, führen nicht zum vorzeitigem Abbruch der Proteintranslation. Eine Abnahme der Proteinmenge ist daher nicht zwingend. Zwar kann die Gesamtmenge an exprimiertem *GLI3* unverändert sein, jedoch ist möglicherweise die funktionelle Verfügbarkeit des Genproduktes betroffen. Eine veränderte Proteinstruktur des *GLI3*-Transkriptionsfaktors könnte so zu einer 'funktionellen' Haploinsuffizienz führen, deren Auswirkung auf den Phänotyp einer Gen-Haploinsuffizienz vergleichbar ist. Ebenso könnte ein dominant-negativer Effekt auf Wildtypproteine des nicht betroffenen Allels und/oder anderer *GLI* Proteine eine Rolle spielen, indem ihre Bindungsstellen durch die veränderten *GLI3*-Proteine besetzt werden, ohne dass diese funktionell aktiv wären.

Durch Mutationen veränderte Spleißvorgänge können den Fehlbildungsphänotyp durch verkürzte (Gen-Haploinsuffizienz), als auch durch funktionell veränderte (funktionelle Haploinsuffizienz) Proteine hervorrufen (siehe 2.3.1).

5.2.1 Mutationen im N-terminalen und ZFD-Bereich des *GLI3*-Gens

Von den in dieser Arbeit identifizierten Mutationen im *GLI3*-Gen betreffen 9 den N-Terminus oder die ZFD des *GLI3*-Transkriptionsfaktors.

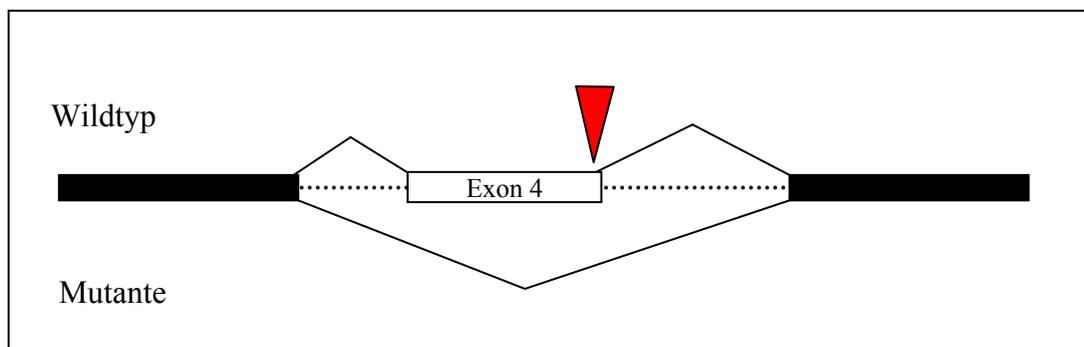
Im einzelnen konnten bei GCPS Patienten die Nonsense-Mutationen **Y122X**, **L162X** und **L370X** im *GLI3*-Gen detektiert werden. Diese verkürzen durch den vorzeitigen Translationsstop das *GLI3*-Protein im N-terminalen Bereich vor der ZFD (aa 462-645). Dies führt zum Verlust aller bekannten funktionell wichtigen Domänen, inklusive der DNA-Bindungsdomäne. In diesen Fällen ist der GCPS-Phänotyp bei heterozygoten Merkmalsträgern wahrscheinlich auf eine Haploinsuffizienz des *GLI3*-Transkriptionsfaktors zurückzuführen.

Expressionsstudien (unveröffentlichte Daten von Sylvia Thieltges) zeigten, dass der "Nonsensecodon vermittelte mRNA-Abbau" (Nonsense mediated Decay, NMD) für Mutationen der ersten 14 Exons des *GLI3*-Gens eine entscheidende Rolle spielt (siehe 5.4).

Die Frameshift-Mutation **R114fsX158** im *GLI3*-Gen eines GCPS Patienten führt durch das veränderte Leseraster zur Bildung eines vorzeitigen Stoppcodons. Ebenso wie bei den oben genannten Mutationen entsteht ein carboxyterminal stark verkürztes *GLI3*-Protein ohne DNA-Bindungsfähigkeit. Auch hier handelt es sich wahrscheinlich um eine Nullmutante für *GLI3*, was mit dem Mechanismus der Haploinsuffizienz vereinbar ist.

Die Mutation **c.473+1G>A (IVS4+1G>A)** im *GLI3*-Gen eines GCPS Patienten führt zur Veränderung des hochkonservierten GT (siehe 5.2) der 5'Spleißstelle des Introns 4. Durch den veränderten Exon-Intron Übergang wird die eigentliche Spleißstelle nicht mehr erkannt. Es kann durch aberrantes Spleißen zum Verlust des Exons IV (Exon skipping) kommen (siehe Abbildung 5.2). Die Deletion von Exon IV wäre mit einer Leserasterverschiebung verbunden (Out-of-frame Deletion), die ein vorzeitiges Stoppcodon an der Aminosäureposition 215 kodierte und damit ein verkürztes

Translationsprodukt hervorbrächte. Auch hier könnte über den Mechanismus der Haploinsuffizienz der Phänotyp bedingt werden. Exon skipping ist ein bevorzugtes Muster von aberranten Spleißvorgängen bei veränderten 5' Intronkonsensussequenzen (Talerico *et al.*, 1990; Nakai *et al.*, 1994). Aber auch andere alternative Spleißmuster können nicht ausgeschlossen werden.



Die Boxen repräsentieren Exons 3, 4 und 5 des *GLI3*-Gens. Dazwischen befinden sich (unterbrochene Linie) die Introns. Die gewinkelten Linien beschreiben die Spleißvorgänge. Das obere Spleißmuster gilt für den Wildtyp, das untere für die Mutante. Der rote Pfeil markiert die Lokalisation der Mutation an der 5' Intronkonsensussequenz des Introns. Exon skipping bedeutet, dass das veränderte Spleißmuster zum Verlust des benachbarten Exons 4 führt.

Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Exon-skipping

Die Mutation **c.473+1G>A (IVS4+1G>A)** wurde bereits zuvor bei einem unverwandten GCPS Patienten beschrieben (Kalff-Suske *et al.*, 1999). Möglicherweise handelt es sich hier um eine Gensequenz, die häufiger als andere von Mutationen betroffen ist, um einen sogenannten Hotspot. Weitere unabhängig sich wiederholende Mutationen können möglicherweise durch höhere Zahlen der molekularbiologisch untersuchten GCPS Fälle identifiziert werden. Dies zeigt auch die erneute Detektion der Frameshift-Mutation **L1146fsX1246** bei einem deutschen GCPS Patienten (C. Bergmann und U. Aulepp).

Die Mutation **IVS10+4_5insTA** im *GLI3*-Gen eines GCPS Patienten verändert die 5'Spleißstelle des Introns 10 und könnte so zu einem *GLI3*-Protein ohne oder mit verminderter DNA-Bindungsfähigkeit führen. ‚Exon skipping‘ könnte zu einer ‚in frame‘ Deletion des Exons X, das für den ersten Zinkfinger kodiert, führen. Obwohl dieser nicht direkt am DNA-Kontakt beteiligt ist, interagiert er intramolekular mit dem zweiten Zinkfinger (Pavletich und Pabo, 1993). Dadurch könnte die Stabilität oder Spezifität der *GLI3*-DNA-Bindung beeinträchtigt werden. Auch eine

Verkürzung des Proteins und eine dadurch bedingte Haploinsuffizienz durch ein verändertes Spleißmuster wäre denkbar.

Die Spleißstellenmutation **c.1647+1_2delGT (IVS11+1_2delGT)** im *GLI3*-Gen eines GCPS Patienten verändert die 5' Spleißstelle des Introns 11. Dies könnte ebenfalls durch alternatives Spleißen zu einem GLI3-Protein ohne oder mit verminderter DNA-Bindungsfähigkeit führen. Durch eine in ‚frame Deletion‘ von Exon XI könnte es zum Verlust des dritten Zinkfingers der DNA-bindenden Domäne von GLI3 kommen. Während dem ersten Zinkfinger Protein-Protein-Interaktionen mit dem zweiten Zinkfinger zugeschrieben werden, bilden die Zinkfinger zwei und drei die Verbindung zum DNA-Rückgrat. Die fingerartige Struktur des Zinkfingermotivs, die zur DNA-Bindung nötig ist, würde zerstört werden. Damit wäre die Bindungsfähigkeit des mutierten GLI3-Proteins an die DNA in Frage gestellt.

Der Patient mit der oben genannten Mutation wurde im Centre for Human Genetics in Leuven klinisch untersucht. Die Untersuchung zeigte, dass der Patient neben den typischen GCPS Merkmalen auch von einer geistigen Retardierung betroffen war. Geistige Retardierung wurde im Zusammenhang mit GCPS bisher ausschließlich bei Patienten mit Chromosomenanomalien beschrieben (Pettigrew *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1997; Kroisel *et al.*, 2001). Die Karyotyp-Analyse erbrachte bei diesem Patienten aber keinen Hinweis auf Chromosomenanomalien. So scheint es auch eine Assoziation von GCPS und geistiger Retardierung bedingt durch Punktmutationen im *GLI3*-Gen zu geben. Vater und Schwester des Patienten sind ebenfalls von GCPS und einer geistigen Retardierung betroffen. Auch die Mutter ist von einer geistigen Retardierung betroffen, zeigt aber hinsichtlich eines GCPS keine Auffälligkeiten. Leider konnten molekularbiologische Untersuchungen nur bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patienten durchgeführt werden.

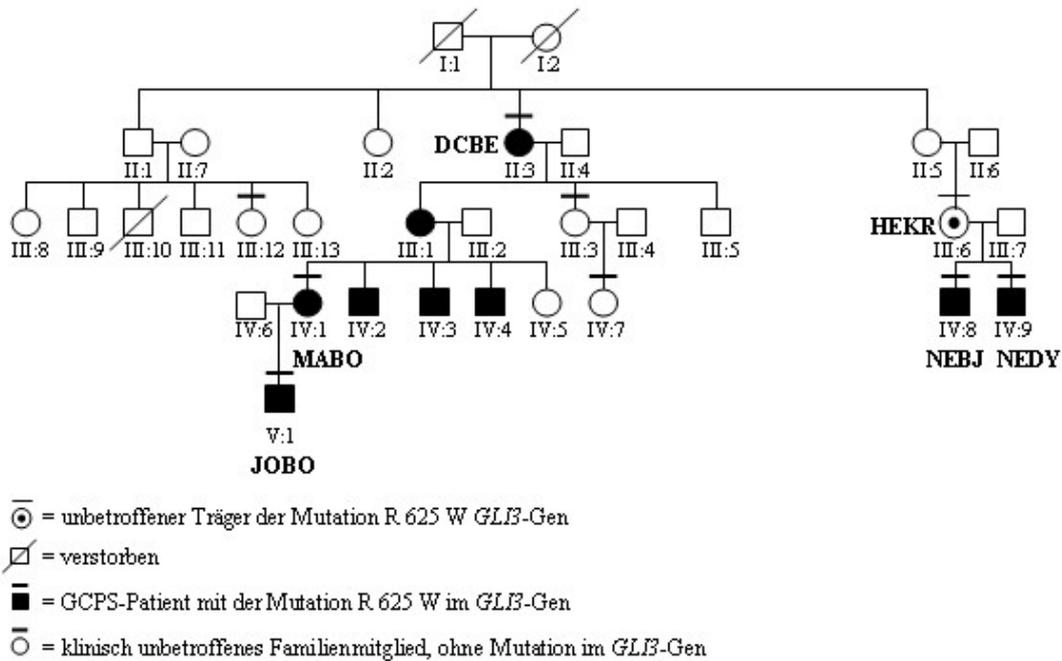
Auch die Missense Mutation **L624P** im *GLI3*-Gen, die bei einem Patienten mit klinisch diagnostiziertem PHS identifiziert wurde, betrifft die zentrale Zinkfingerdomäne des GLI3-Proteins. Die Substitution von Leucin (L) durch Prolin (P) an Position 624 der Aminosäuresequenz von GLI3 befindet sich im sogenannten H-C-Link zwischen dem vierten und dem fünften letzten Zinkfinger. Erstmals wurde hiermit eine nicht Protein-verkürzende Mutation bei einem PHS Patienten detektiert. Kristallographische Aufnahmen der GLI1-DNA-Interaktion zeigten, dass sowohl der vierte als auch der fünfte Zinkfinger den Kontakt zur 9 bp Konsensussequenz

herstellen (Pavletich *et al.*, 1993). Aufgrund der Homologie von GLI3 zu GLI1 (2.2.2) lassen diese Daten vermuten, dass eine Mutation im fünften Zinkfinger des GLI3-Transkriptionsfaktors zum Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit führt. Leider standen keine weiteren Probanden aus dieser Familie für zur Verfügung, um die Ursächlichkeit dieser Missense-Mutation für das PHS zu erhärten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Missense-Mutation **R625W** bei einem Patienten mit GCPS detektiert. Auch diese Mutation verändert die Aminosäuresequenz des fünften Zinkfingers. Im Rahmen von Bindungsstudien wurde die Auswirkung der Zinkfinger-Mutation R625Q (Missense-Mutationen eines Polydaktylie-Patienten) auf das Bindungsverhalten der Zinkfingerpeptide an die DNA untersucht (Dissertationsarbeit von Martina Weßling). Dabei wurde eine beeinträchtigte DNA-Bindungsfähigkeit vermutet. Die Ergebnisse zeigten jedoch keinen Unterschied im DNA-Bindungsverhalten zwischen dem Wildtyp- und dem an Position 625 mutierten Zinkfingerpeptid. Dieses Ergebnis stellt somit die Ursächlichkeit der Mutation für den Phänotyp in Frage, dies gilt möglicherweise auch für die Mutation R625W. So kann, ohne weitere Untersuchungen auch in diesem Fall, nicht von einer krankheitsverursachenden Sequenzveränderung gesprochen werden. Neben der veränderten DNA-Bindungsfähigkeit könnten aber auch andere Mechanismen zur Ausbildung des PHS-Phänotyps wirksam sein. So verändert die Mutation die erste Aminosäure der Konsensussequenz eines zweigeteilten Kernlokalisationssignals (NLS, aa 625-629 bzw. aa 640-643), welches den gerichteten Transport in den Zellkern vermittelt. Damit könnte der nukleäre Transport von GLI3 gestört sein; es käme möglicherweise zu einer deregulierten Lokalisation des GLI3-Proteins im Cytoplasma, was den GCPS-Phänotyp auslösen könnte.

Die Missense Mutation **R625W** wurde bereits zuvor bei einem Patienten einer anderen Patientengruppe identifiziert. Nachfragen bei Kollegen der Universität Leuven, die beide Patienten mit einer Missense-Mutation R625W betreuen, zeigte einen familiären Zusammenhang beider Mutations-Träger auf. Somit handelt es sich bei der Mutation R625W des Patienten MR 2455 nicht um eine wiederholt unabhängig auftretende Mutation, sondern um eine familiäre Sequenzveränderung. Im Centre for Human Genetics der Universität Leuven wurden daraufhin mehrere Familienmitglieder klinisch auf GCPS untersucht. Die Befunde wurden durch DNA-Sequenzanalyse des *GLI3*-Gens bei uns abgesichert. Der Stammbaum der Familie

zeigt mindestens 9 von GCPS betroffene Familienmitglieder in vier Generationen. Der in dieser Arbeit untersuchte Patient MR 2455 ist im Stammbaum in Abbildung 5.3 mit der Identifikationsnummer IV:9 (NEDY) aufgeführt. Die Mutationsanalysen bei den von GCPS betroffenen Familienmitgliedern II:3 (DCBE), IV:1 (MABO), IV:8 (NEBJ) und V:1 (JOB0) identifizierten bei allen die Mutation R625W im *GLI3*-Gen. Die Sequenzanalyse des *GLI3*-Gens der klinisch nicht von GCPS betroffenen Familienmitglieder III:3, III:12 und IV:7 zeigte keine Veränderungen. Die Vererbung der Mutation R625W korreliert also mit dem GCPS Phänotyp über vier Generationen in einem Zweig des Stammbaumes (II-3, IV-1, V-1). Jedoch konnte die Mutation auch bei einem phänotypisch unbetroffenen Familienmitglied (III:6, HEKR; im Stammbaum durch einen Punkt gekennzeichnet) nachgewiesen werden. Die Mutationsträgerin HEKR überträgt die Sequenzveränderung auf ihre zwei an GCPS erkrankten Söhne IV:8 (NEBJ) und IV:9 (NEDY). Erstmals stellt dies die bisher angenommene 100%ige Penetranz in Frage. Untersuchungen großer von GCPS betroffener Familien ließen 1978 eine 100%ige Penetranz vermuten (Temtamy and McKusick, 1978). Molekularbiologische Untersuchungen einiger Familien mit GCPS bestätigten bisher diese Vermutungen über die komplette Penetranz (Wild *et al.*, 1997, Kalff-Suske *et al.*, 1999). Aufgrund der wenigen bisher molekularbiologisch untersuchten Familien, ist es zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, zu entscheiden, ob bestimmte Mutationstypen oder aber ein bestimmter funktioneller Defekt des *GLI3*-Proteins mit unvollständiger Penetranz assoziiert sind. Vorstellbar ist, dass bestimmte Mutationen erst im Zusammenspiel mit zusätzlichen Variationen im gleichen oder anderen Genen zum tragen kommen, d.h. krankheitsverursachend werden.



Alle anders gekennzeichneten Familienmitglieder wurden nicht auf Mutationen im *GLI3*-Gen untersucht.

Den Familienmitgliedern sind Nummern zugeordnet, die auch im Text verwendet werden. Eine horizontale Linie über dem Stammbaumsymbol zeigt an, dass das entsprechende Familienmitglied klinisch auf GCPS untersucht wurde. Die GCPS-Patienten II:3 (DCBE), IV:8 (NEBJ), IV:9 (NEDY) und V:1 (JOB) sind Träger der Mutation R625W. Die nicht von GCPS betroffenen Familienmitglieder III:3, III:12 und IV:7 haben keine Mutation in der kodierenden Region des *GLI3*-Gens. Beim nicht von GCPS betroffenen Familienmitglied III:6 (HEKR) konnte ebenfalls die Mutation R625W detektiert werden.

Abbildung 5.3: Stammbaum der Familie des Probanden MR 2455

5.2.2 Mutationen im C-terminalen Bereich des *GLI3*-Gens

Die 7 weiteren identifizierten Mutationen betreffen den *GLI3*-Transkriptionsfaktor im C-terminalen Bereich hinter der ZFD. Mutationen in diesem Bereich lassen die DNA-Bindungsdomäne des *GLI3*-Proteins funktionell intakt, führen aber dennoch zu den gleichen phänotypischen Veränderungen wie Mutationen im N-terminalen Bereich (siehe 5.2.1). Somit zeigen die C-terminal lokalisierten Mutationen, dass die Transaktivierungsdomänen TA₁ und TA₂ für die Funktion des *GLI3*-Proteins ebenso wie die ZFD von zentraler Bedeutung sind. Die Fähigkeit zur Transkriptionsrepression dürfte jedoch durch die C-terminal veränderten Proteine nicht beeinflusst sein (Kalff-Suske et al., 1999), insofern die Proteinestabilität der Mutanten nicht beeinträchtigt ist.

Die Nonsense-Mutation **S865X** im *GLI3*-Gen eines PPD-IV-Patienten ist innerhalb der hochkonservierten Region 4 (aa 844-871) lokalisiert. Die DNA-Bindungsdomäne von *GLI3* bleibt somit intakt, jedoch würden im verkürzten *GLI3*-Protein die transaktivierenden Domänen TA_1 und TA_2 fehlen. Dies könnte zum Funktionsverlust von *GLI3* führen und damit die phänotypische Ausprägung erklären. Aber auch dominant-negative Effekte des verkürzten Proteins könnten krankheitsverursachend sein.

Die zweite identifizierte Mutation eines PPD-IV Patienten ist die Frameshift-Mutation **E1152fsX1246**, die zu einem vorzeitigen Kettenabbruch an Position 1246 der Aminosäuresequenz führt. Es kommt zu einem innerhalb der TA_2 (aa 1044-1322) verkürzten Protein, ebenso wie bei der von Radhakrishna *et al.*, 1999 beschriebenen Frameshift Mutation E1216fsX1246 im *GLI3*-Gen eines PPD-IV-Patienten. Die TA_2 Domäne ist somit nicht vollständig, und der so trunkierte Transkriptionsfaktor scheint für die phänotypische Ausprägung der PPD-IV verantwortlich zu sein.

Für PPD-IV wurde bisher nur Frameshift Mutation E1216fsX1246 des *GLI3*-Gens in der Literatur beschrieben (Radhakrishna *et al.*, 1999). Eine weitere, nicht veröffentlichte Mutation c.1251delC; P417fsX423 (siehe Abb. 5.1) sowie die in dieser Arbeit identifizierten Mutationen bei Patienten mit PPD-IV zeigen keinen Hinweis auf eine Korrelation der Lokalisation der Mutation im *GLI3*-Gen mit dem PPD-IV Phänotyp.

Die Frameshift Mutation **C979fsX1002** im *GLI3*-Gen eines PHS Patienten führt, ebenso wie die Frameshift Mutationen **E1146fsX1246** und **S1522fsX1534** von GCPS Patienten, durch die Leserasterverschiebung zu einem verkürzten Translationsprodukt. Bei diesen Mutationen kommt es zum kompletten oder teilweisen Verlust der zwei Transaktivierungsdomänen (TA_2 aa 1044-1322; TA_1 aa 1376-1580). Da auch Mutanten mit vollständiger TA_2 (S1522fsX1534) ein GCPS aufweisen, ist anzunehmen, dass sowohl TA_2 als auch TA_1 für die Aktivierung von Zielgenen durch *GLI3* notwendig ist. Dennoch wurde gezeigt, dass die TA_2 Domäne unabhängig von TA_1 transkriptionelle Aktivierung vermitteln kann (Kalff-Suske *et al.*, 1999). C-terminal verkürzte Proteine mit intakter Zinkfingerdomäne, aber ohne Transaktivierungsdomänen, könnten aber auch das Wildtyp Protein des gesunden Allels und/oder andere *GLI* Faktoren beeinflussen: Durch die Besetzung der

Bindungsstellen durch verkürzte GLI3-Proteine ohne oder mit eingeschränkter funktioneller Aktivität kann ein dominant-negativer Effekt entstehen.

Weshalb die Frameshift-Mutation C979fsX1002 zum PHS-Phänotyp führt, muß zur Zeit noch unbeantwortet bleiben. Allerdings wurde eine andere Frameshift-Mutation, die ebenfalls ein vorzeitiges Stoppcodon bei aa 1002 bedingt, bereits für einen PHS Fall beschrieben (Kalff-Suske *et al.*, 2000).

Die Frameshift Mutationen E1152fs1246X sowie E1216fs1246X (Radhakrishna *et al.*, 1999) zweier PPD-IV Patienten und L1146fsX1246 eines GCPS Patienten verkürzen durch den Einbau eines vorzeitigen Stoppcodons das GLI3-Protein an derselben Aminosäureposition. Hier ist unklar, wie es zu den zwei unterschiedlichen Phänotypen kommen kann. Durch die Deletion von 17 Nukleotiden (c.3437-53del17) führt die Frameshift Mutation E1146fsX1246 des GCPS Patienten nicht nur zur Leserasterverschiebung und zum vorzeitigen Translationsstopp, sondern auch zur Deletion von 5 Aminosäuren im GLI3-Protein. Dagegen kommt es bei den Mutationen der PPD-IV Patienten durch eine Insertion zur Leserasterverschiebung. Zudem betrifft die Frameshift-Mutation des GCPS Patienten die Aminosäuresequenz bereits ab Position 1146, die Mutationen der PPD-IV Patienten dagegen erst ab Position 1152 bzw. 1216.

Das Modell einer ‚partiellen Inaktivierung‘ ist bei den letzteren 5 beschriebenen Mutationen wahrscheinlich nicht ausreichend, denn die Entstehung der unterschiedlichen Phänotypen kann damit nicht hinreichend erklärt werden. Es muß noch andere Mechanismen geben, die für die phänotypische Ausprägung bestimmter Mutationen eine Rolle spielen. Dabei kann es sich sowohl um Mutationen im zweiten Allel des *GLI3*-Gens handeln als auch um eine zusätzliche zur *GLI3*-Sequenzveränderung vorhandene Mutation in ‚Modifier-Genen‘, eventuell aus der SHH-Signalkaskade. Möglicherweise sind auch paraloge GLI-Gene mutiert und beeinflussen somit zusätzlich den Phänotyp. Um dies zu zeigen, muß geprüft werden, ob beide *GLI3*-Allele anwesend und intakt sind. Zusätzlich müsste eine Mutationssuche in weiteren SHH-assoziierten Genen etabliert werden. Allerdings könnten phänotypische Unterschiede auch durch differentielle Stabilität der Proteine hervorgerufen werden.

Bei der Missense-Mutation **c.3453C>G** im *GLI3*-Gen eines GCPS Patienten kommt es zwar auf DNA Ebene zur Transition C>G, aufgrund der Degeneration des genetischen Codes kommt es aber auf Proteinebene zu keinem Aminosäureaustausch (P1151P). Man spricht von einer stillen Mutation. Eine Kausalität dieser Mutation für den GCPS Phänotypen ist somit eher unwahrscheinlich. Unterstützend kommt hinzu, dass der nicht von GCPS betroffene Vater ebenso von der stillen Mutation betroffen ist. Da die SSCA-Analyse des Exon-Fragmentes XV-9 von 100 Kontrollpersonen die Veränderung nicht nochmals zeigte, ist definitionsgemäß von einer seltenen Variante zu sprechen. Allerdings konnte keine, als ursächlich anzusehende, weitere Sequenzveränderung bei diesem GCPS-Patienten nachgewiesen werden.

Auch für die Missense-Mutation **c.2119C>T (P707S)** im *GLI3*-Gen eines GCPS-Patienten kann nicht ohne weiteres von einer den Phänotyp bedingenden Mutation ausgegangen werden, da auch der klinisch nicht von GCPS betroffene Vater des Patienten die Sequenzveränderung in der SSCA-Analyse zeigt. Man spricht von einem nicht-kausalen-Nukleotidaustausch. Allerdings kann auch eine verminderte Penetranz nicht ausgeschlossen werden.

5.3 Interpretationsmöglichkeiten der erfolglosen Mutationssuche im *GLI3*-Gen bei insgesamt 18 von 35 Patienten

Im Patientenkollektiv von GCPS konnte in 58% der untersuchten Fälle keine krankheitsverursachende Mutation im *GLI3*-Gen identifiziert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei den PHS und PPD-IV Patientenkollektiven, bei denen in jeweils 50-75% bzw. 60% der Fälle keine krankheitsverursachende Mutation im *GLI3*- Gen detektiert werden konnte. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für diese Ergebnisse:

5.3.1 Methodische Grenzen der Mutationssuche

Die Sequenzveränderungen der untersuchten DNA-Fragmente wurden mit der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA) detektiert. In einer Studie von Hayashi (1992) hat sich gezeigt, dass die Sensitivität der SSCA am höchsten ist, wenn der zu

analysierende Abschnitt eine Länge von 200 Basen nicht überschreitet. In diesem Fall kann eine Detektionsrate von 70-97% erreicht werden (Sheffield *et al.*, 1993). In dieser Arbeit wurden PCR Amplifikationsprodukte von weniger als 300 bp angestrebt (siehe 3.2.2.1). Somit ist mit einer hohen, aber eben nicht hundertprozentigen Detektionsrate zu rechnen.

Möglicherweise wird ein gewisser Teil der *GLI3*-Morphopathien durch Mikrodeletionen innerhalb der >250kb großen *GLI3*-Genregion hervorgerufen. Mikrodeletionen, die sich über mehrere Exons erstrecken, können durch die SSCA nicht nachgewiesen werden. Ist noch ein intaktes Allel vorhanden, zeigt das SSCA-Bandenmuster keine qualitative Abweichung von der Normalkontrolle. Nur für bestimmte Genregionen des *GLI3*-Gens konnten Deletionen über die Heterozygotität an bekannten polymorphen Stellen innerhalb der codierenden *GLI3* Region ausgeschlossen werden (z.B. liefert bei den Exon-Fragmenten V-1 und V-2 die Position c.547G>A einen nützlichen Polymorphismus). Durch zytogenetische Karyotypisierung konnten bei einigen Patienten große Deletionen ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 3.7).

Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Festlegung der klinischen Diagnose. Die vier *GLI3*-Morphopathien sind zwar in ihrer Ausprägung klinisch unterschiedlich, aber es gibt dennoch überlappende Merkmale innerhalb dieser Morphopathien (siehe Tabelle 2.2), sowie mit anderen Extremitätenfehlbildungen. Die Krankheitsmerkmale einzelner Patienten sind dabei nicht immer eindeutig einem bestimmten Krankheitsbild zuzuordnen. Ebenso ist die intrafamiliäre Ausprägung sehr unterschiedlich; ob nun zusätzliche genetische Faktoren oder aber Umwelt-Einflüsse für diese Variation verantwortlich sind, ist zur Zeit noch nicht bekannt.

5.3.2 Genetische Ursachen

Mutationen, die eine Veränderung der *GLI3*-mRNA-Menge bewirken, die für die normale zeitliche und räumliche Entwicklung notwendig ist, bleiben bei der jetzigen Mutationssuche unberücksichtigt. Untersuchungen auf mRNA-Ebene könnten bei bisher ungeklärten Fällen ursächliche Veränderungen aufdecken, die der hier verwendeten Methode entgehen (siehe 5.5). Zu dieser Kategorie gehören ebenfalls die bereits im vorherigen Abschnitt angesprochenen Mikrodeletionen.

Für den PAP-A Fall, der in dieser Arbeit untersucht wurde (siehe Tabelle 4.4), konnte im *GLI3-Gen* mit der SSCA-Methode keine Mutation gezeigt werden. Dieser Fall könnte möglicherweise auch mit anderen Genen als dem *GLI3-Gen* assoziiert sein. So zeigten genetische Untersuchungen, dass mindestens zwei autosomal dominante Loci, für den PAP-Phänotyp verantwortlich sind. Zaho *et al.*, 2002 konnten in einer chinesischen Familie mit PAP-A/B durch Kopplungsanalysen signifikant positive LOD scores für Marker auf Chromosom 19p finden. Die Region konnte auf den Genbereich 19p13.2-13.1 eingegrenzt werden. Somit könnte die genetische Ursache der PAP-A des untersuchten Patienten auch auf Chromosom 19p lokalisiert sein.

Auch bei den anderen Patienten der Gruppe IV (Probanden mit verschiedenen isolierten und syndromalen Polydaktylien) konnte im *GLI3-Gen* keine krankheitsverursachende Mutation identifiziert werden. Wahrscheinlich spielen noch weitere bisher unbekannte und im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchte Genloci eine wichtige Rolle in der Entstehung dieser Extremitätenfehlbildungen.

Zusätzlich kann aufgrund der Untersuchungen dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass sich Mutationen im *GLI1-* oder *GLI2-Gen* aufgrund zur Zeit nicht aufgeklärter Redundanzen phänotypisch als GCPS, PHS, PPD-IV oder PAP-A/B äußern.

5.4 Bewertung der identifizierten Mutationen im *GLI3-Gen* und Ausblick

Nur Mutationen, die den *GLI3*-Transkriptionsfaktor carboxyterminal so verkürzen, dass es zum Verlust der Zinkfingerdomäne kommt, sind eindeutig mit dem Modell der Haploinsuffizienz zu erklären. Für Mutationen im *GLI3-Gen*, die nicht zum vorzeitigen Kettenabbruch führen (Missense-Mutationen, evtl. Frameshift-Mutationen, Spleißstellen-Mutationen) sind weitere funktionelle Experimente notwendig, um deren molekulare Auswirkung auf den Phänotyp zu erklären. Eine funktionelle Haploinsuffizienz muß in diesen Fällen im Einzelfall für die phänotypische Ausprägung der Erkrankung nachgewiesen werden.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit, entgegen der bisher angenommenen 100%igen Penetranz, eine Mutationsübertragung über eine phänotypisch unauffällige Probandin nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse bei der Interpretation der molekularbiologischen Ergebnisse. So interpretierte man

bisher seltene Sequenzvarianten (< 1% in der Vergleichspopulation) phänotypisch unauffälliger Probanden nicht als relevant für das Entstehen einer GLI3-Morphopathie. Vor dem Hintergrund einer nicht vollständigen Penetranz sollten somit in Zukunft auch diese seltenen Sequenzvarianten auf Proteinebene hinsichtlich einer veränderten GLI3-Funktion und möglicher Interaktionen mit anderen Faktoren untersucht werden.

Nachweisverfahren zur Testung der funktionellen Aktivität des GLI3-Wildtyp-Proteins bzw. seiner mutierten Form wurden in der Arbeitsgruppe Kalff-Suske von Martina Weßling im Rahmen einer Dissertationsarbeit etabliert. Diese umfassen Analysen der DNA-Bindung, der Aktivierung und Repression der Transkription sowie der intrazellulären Lokalisierung von GLI3. Auf dieser Grundlage werden in Zukunft die Auswirkungen von Mutationen im *GLI3*-Gen auf die Proteinstruktur genauer untersucht werden können.

Bei der Deutung der GLI3-trunkierenden Mutationen muß ein weiterer Aspekt beachtet werden: Diese Mutationen führen nicht zwangsläufig zur Synthese verkürzter Proteine. Ein Teil der Nonsense-RNA-Transkripte wird von der Zelle erkannt und effizient über einen Weg, der als ‚nonsense mediated mRNA decay‘ (NMD) bezeichnet wird, abgebaut (Culbertson, 1999; Frischmeyer und Dietz, 1999; Hentze und Kulozik, 1999). Dieser Überwachungsmechanismus ist in Eukaryonten allgegenwärtig und soll den Organismus vor den dominant-negativen oder ‚gain-of-function‘ Effekten der verkürzten Proteine schützen, die sich sonst ergeben würden, wenn die Nonsense-Transkripte stabil wären. Wie die Zelle ein vorzeitiges Stoppcodon erkennt und von einem normalen unterscheidet, und wo und wie dieser Vorgang stattfindet, ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung. Ein Erkennungsmerkmal scheint das Vorhandensein mindestens eines Introns jenseits des Nonsensecodons zu sein. Nonsense-Transkripte von Minigenen ohne Introns entgehen meist dem NMD. Dem sogenannten ‚translational translocation-model‘ nach, wird das kodierende Potential eines Transkriptes bei der Passage durch die Kernporen überprüft noch bevor die 5‘ Prozessierung abgeschlossen ist. Um zu testen, ob GLI3-mRNA mit trunkierenden Mutationen dem Mechanismus des NMD unterliegen, wurde in der Arbeitsgruppe Kalff-Suske von Sylvia Thieltges die Menge der mutierten m-RNA im Vergleich zur Menge von Wildtyp DNA untersucht. Transkripte mit trunkierenden Mutationen an Position 309 oder 366 der cDNA wurden in niedrigerer Konzentration gemessen (20-40%) im Vergleich zur Wildtyp-

Konzentration des *GLI3* m-RNA Transkriptes. Dagegen findet man identische m-RNA Konzentrationen bei Mutationen im *GLI3*-Gen, die sich im letzten Exon befinden. Das würde bedeuten, dass Mutationen im letzten Exon des *GLI3*-Gens nicht dem NMD unterliegen. Haploinsuffizienz scheint also für Mutationen in den ersten 14 Exons eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Phänotyps zu spielen. Andere Mechanismen scheinen bei Mutationen im Exon 15 des *GLI3*-Gens eine Rolle zu spielen, so z.B. die Proteininstabilität oder funktionelle Haploinsuffizienz.

Die nunmehr annähernd 50 identifizierten Mutationen (16 in dieser Arbeit), lassen eine erneute Bewertung der Häufigkeit der Punktmutationen zu. Bisher wurden nur drei Punktmutationen mehrfach in jeweils unabhängigen Familien identifiziert. Dabei handelt es sich um die R702X, die 3 im *GLI3*-Gen bei 3 unabhängigen Patienten detektiert wurde. Die Spleißstellenmutation IVS4+1G>A(c.473+1G>A) und die Frameshiftmutation L1146fsX1246 konnten in jeweils zwei sporadischen Fällen identifiziert werden.

Die Häufigkeit dieser Mutationen ist dennoch zu gering, um mit Sicherheit auf Anwesenheit von 'Mutation-Hot-Spots' schließen zu können. Zur molekularen Aufklärung von *GLI3*-Defekten muß somit auch in Zukunft die komplette Analyse des Gens durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

Alexandre , C, Jacinto, A and Ingham, PW (1996)

Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the Cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* **10**: 2003-2013.

Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA and Struhl, K (1994).

“Current protocols in Molecular Biology.”
Greene publishing and Wiley-Interscience, New York.

Aza-Blanc, P Ramirez-Weber, F-A, Laget, M-P, Schwartz, C and Kornberg, TB (1997).

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

Aza-Blanc. P, Lyn, HY, Ruiz i Altaba,A and Kornberg, TB (2000).

Gli proteins in *Drosophila* reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development* **127**: 4293-4301.

Baraister, M, Winter, RM and Brett, EM (1983).

Greig cephalopolysyndactyly: report of 13 affected individuals in three families. *Clin Genet.* **24**: 257-263.

Biesecker, LG (1997).

Strike three for GLI3. *Nature Genet.* **17**: 259-260.

Brueton, LA, Huson, SM, Winter, RM and Williamson, R (1988).

Chromosomal localisation of a developmental gene in Man: direct DNA analysis demonstrates the Greig Cephalopolysyndactyly maps to 7p13. *Am J Med Genet.* **31**: 799-804.

Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A.M., Eisenberg, A.J. and Allen, R.C. (1991).

Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet.* **48**: 137-144.

Chen, CH, DP von Kessler, Park, W, Wang, B, Ma, Y and Beachy, PA (1999).

Nuclear trafficking of Cubitus interruptus in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression. *Cell* **98**: 305-316.

Cohn MJ, Tickle C (1996).

Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends Genet* **12**: 253-257.

Culbertson, MR (1999).

RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet.* **15**: 74-80.

Dai, P, Akimaru, H, Tanaka, Y, Maekawa, T, Nakafuku, M and Ishii, S (1999).

Sonic hedgehog-induced activation of the gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem.* **274**: 8143-8152.

den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000).

Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion.

Hum Mutat. **15**: 7-12.

Diaz LL, Grech, KF and Prados, MD (1991-1992).

Hypothalamic hamartoma associated with Laurencs-Moon-Biedel syndrome. Case report and review of the literature.

Pediatr Neurosurg. **17**: 30-33.

Drabkin, H, Wright, M, Jonsen, M, Varkony, T, Jones, C, Sage, M, Gold, S, Morse, H, Mendez, M and Erickson, P (1990).

Development of a somatic cell hybrid mapping panel and molecular probes for human chromosome 3.

Genomics **3**: 435-446.

Echelard, Y, Epstein, DJ, St-Jaques, B, Shen, L, Mohler, J, McMahon, JA and Mahon, AP (1993).

Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity.

Cell **75**: 1417-1430.

Frazier, TM (1960).

A note on race-specific congenital malformations rates.

Am J Obstet. Gynec. **80**: 184-185.

Frischmeyer, PA and Dietz, HC. (1999).

Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease.

Hum Mol Genet. **8**: 1893-1900.

Hall, JG, Pallister, PD, Clarren, SK, Beckwith, JB, Wiglesworth, FW, Fraser, FC, Cho, S, Benke, PJ and Reed, SD (1980).

Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus, and postaxial polydactyly-a new syndrome ?

Part I : clinical, causal, and pathogenetic considerations.

Am J Genet. **7**: 47-74.

Hammerschmidt, M., Brook, A. and McMahon, A.P. (1997)

The world according to hedgehog.

Trends Genet. **13**: 14-21.

Hentze, MW and Kulozik, AE (1999).

A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay.

Cell **96**: 307-310.

Hogan, BLM (1999)

Morphogenesis.

Cell **96**: 225-233.

Innis, JW and Mortlock, DP (1998)

Limp development: molecular dymorphology is at hand.

Clin Genet. **53**: 337-348.

- Jacobson , E.** (1996).
Charakterisierung einer Kontrollregion des Kandidatengens für das Greig-Syndrom.
Diplomarbeit im Studiengang Humanbiologie der Philipps-Universität Marburg.
- Johnson, D.L. and Tabin, C.J.** (1997)
Molecular models for vertebrate limb development.
Cell **90**: 979-990.
- Kalff-Suske, M, Wild, A, Topp, J, Wessling, M, Jacobsen, E-M, Bornholdt, D, Engel, H, Heuer, H, Aalfs, CM, Ausems, MGEM, Barone, R, Herzog, A, Heutink, P, Homfray, T, Gilessen-Kaesbach, G, König, R, Kunze, J, Meinecke, P, Müller, D, Rizzo, R, Strengge, S, Superti-Furga, A and Grzschik, K-H** (1999).
Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome.
Hum Mol Genet **9**: 1769-1777.
- Kalff-Suke, M, Wessling, M, Bornhold, D, Heuer, H, Engel, H, Castellan, C, de Die-Smulders, C, Brunner, HG, Dyack, S, Fuchs, S, Matthijs, G and Grzeschik, K-H** (2000).
GLI3 mutations in Greig cephalopolysyndactyly syndrome and Pallister-Hall syndrome.
Hum Genet., online submission.
- Kang, S, Rosenberg, M, Ko, VD and Biesecker, LG** (1997 a).
Genetic structure and allelic expression assay of the human *GLI3* gene.
Hum Genet. **101**: 154-157.
- Kang, S, Graham, JM, Olney, Jr, AH and Biesecker, LG** (1997 b).
GLI3 mutations cause dominant Pallister-Hall syndrome.
Nat Genet. **15** : 266-268.
- Kelley, RI** (2000).
Inborn errors of cholesterol biosynthesis.
Adv Pediatr. **47** :1-53.
- Kemp, BE and Pearson RB** (1990).
Protein kinase recognition sequence motifs.
Trends Biochem. Sci. **15**: 342-346.
- Kinzler, KW, Bigner, SH, Bigner, DD, Trent, JM, Law, ML, O'Brien, SJ, Wong, AJ and Vogelstein, B** (1987).
Identification of an amplified, highly expressed gene in human glioma.
Science **236**: 70-73.
- Kinzler, KW and Vogelstein, B** (1990).
The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome.
Mol Cell. Biol. **10**: 634-642.
- Kroisel PM, Petek E, Wagner K.** (2001).
Phenotype of five patients with Greig syndrome and microdeletion of 7p13.
Am J Med Genet. **102**:243-249.
- Krüger, G, Götz, J, Kvist, U, Dunker, H, Erfurth, F, Pelz, L and Zech, L** (1989).
Greig syndrome in a large kindred due to reciprocal chromosome translocation t(6;7)(q27;p13).
Am J Med Gen. **32**: 411-416..
- Kuller, JA, Cox, VA, Schonberg, SA and Golabi, M** (1992).
Pallister-Hall syndrome associated with an unbalanced chromosome translocation.
Am. J. Med. Genet. **43**: 647-650.

- Manouvrier-Hanu, S., Holder-Espinasse, M. and Lyonnet, S.** (1999).
Genetics of limb anomalies in humans.
Trends Genet. **15**: 409-417.
- Marafie, MJ, Temtamy, SA, Rajaram, U, al-Awadi. SA, el-Badramany, MH and Farag, TI** (1996).
Greig cephalopolydactyly syndrome with dysgenesis of the corpus callosum in a Bedouin family.
Am J Med Genet. **66**: 261-264.
- Mullis KB, Faloona FA** (1987).
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. **155**:335-50.
- Murone, M, Rosenthal, A and de Sauvage, FJ** (1999).
Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex.
Curr Biol. **9**: 76-84.
- Nakai K, Sakamoto H.** (1994).
Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes.
Gene **141**:171-1777.
- Orita ,M, Suzuki, Y, Sekya, T and Hayashi, K** (1989).
Rapid and sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaction.
Genomics **5**: 874-879.
- Pavletich, NP and Pabo, CO** (1993).
Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers.
Science **261**: 1701-1707.
- Pelz, L, Kruger, G and Gotz, J** (1986).
The Greig cephalopolysyndactyly syndrome.
Helv Paediatr Acta. **41**: 381-382.
- Pepinsky, RB, Zeng, C, Wen, D, Rayhorn, P, Baker, DP, Williams, KP, Bixler, SA, Ambrose, CM, Garber, EA, Miatkowski, K, Taylor, FR, Wang EA and Galdes, A** (1998).
Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog.
J Biol Chem **237**: 14037-14045.
- Pettigrew, AL, Greenberg, F, Caskey, CT and Ledbetter, DH** (1991).
Greig syndrome associated with an interstitial deletion of 7p: conformation of the localisation of Greig syndrome to 7p13.
Hum Genet. **87**: 452-456.
- Price , MA and Kalderon, D** (1999).
Proteolysis of cubitus interruptus in Drosophila requires phosphorylation by protein kinase A.
Development **19**: 4331-9.
- Radhakrishna, U, Blouin, J-L, Mehenni, H, Patel, UC, Patel, MN, Solanki, JV and Antonarakis, SE** (1997 a).
Mapping one form of autosomal dominant postaxial polydactyly type A to chromosome 7p15-q11.23 by linkage analysis.
Am J Hum Genet. **60**: 597-604.

- Radhakrishna, U, Wild, A, Grzeschik, K-H and Antonarakis, SE** (1997 b).
Mutation in GLI3 in postaxial polydactyly type A.
Nature Genet. **17**: 269-271.
- Radhakrishna, U, Bornhold, D, Scott, HS, Patel, UC, Rossier, C, Engel, H, Bottani, A, Singh, D, Blouin, JL, Solanki, JV, Grzeschik, K-H and Antonarakis, SE** (1999).
The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV (PPD-IV) and postaxial polydactyly type-A/B (PAP-A/B); no phenotype prediction from the position of GLI3 mutations
Am J Hum Genet. **60**: 645-655.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E. and Tabin, C.** (1993).
Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA.
Cell **75**: 1401-1416.
- Riddle, RD and Tabin, C** (1999).
Wie Arme und Beine entstehen.
Spektrum der Wissenschaft **9**: 62-68.
- Robbins, DJ, Nybakken, KE, Kobayashi, R, Sisson, JC, Bishop, JM and Therond, PP** (1997).
hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2.
Cell **90**: 225-234
- Ruppert, JM, Vogelstein, B, Arheden, K and Kinzler, KW** (1990).
GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity.
Mol Cell. Biol. **10**: 5408-5415
- Ruppert, JM, Vogelstein, B and Kinzler, KW** (1991).
The zinc finger protein GLI transforms primary cells in cooperation with adenovirus E1A.
Mol Cell Bio **11**: 5408-5415.
- Ruiz i Altaba, A** (1997).
Catching a Gli-mouse of Hedgehog.
Cell **90**: 193-196.
- Ruiz i Altaba, A** (1999).
Gli proteins and Hedgehog signalling: development and cancer.
Trends in Genet. **15**: 418-425.
- Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T** (1989).
Molecular cloning- a laboratory manual.
Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F, Nicklen, S and Coulson, AR** (1977).
DNA sequencing with chain termination inhibitors.
Proc Nat Acad Sci. **74**: 5463-5467.
- Sasaki, H, Nishizaki, Y, Hui, C, Nakafuku, M and Kondoh, H** (1999).
Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling.
Development **126**: 3915-3924.

- Sheffield, VC, Beck, JS, Kwitek, AE, Sandstrom, DW and Stone, EM.** (1993).
The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitution.
Genomics **16**: 325-332.
- Sisson, JC, Ho, KS, Suayama, K and Scott, MP** (1997).
Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway.
Cell **90**: 235-245.
- Smyth, I, Narang, MA, Evans, T, Heimann, C, Nakamura, Y, Chenevix-Trench, G, Pietsch, T, Wicking, C and Wainwright, BJ** (1999).
Isolation and characterisation of human patched 2 (PTCH2), a putative tumor suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32.
Hum Mol Genet. **8**: 291-297.
- Stone, DM, Hynes, M, Amanini, M, Swanson, TA, Gu, Q, Johnson, RL, Scott, MP, Pennica, D, Goddard, A, Philips, H, Noll, M, Hooper, JE, de Sauvage, F and Rosenthal, A** (1996).
The tumor-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic Hedgehog.
Nature **384**: 176-179
- Stone, DM, Murone, M, Luoh, S, Ye, W, Armanini, MP, Gurney, A, Philips, H, Brush, J, Goddard, A, de Sauvage, FJ, and Rosenthal, A** (1999).
Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli.
J Cell Sci. **122**: 4437-4448.
- Talerico, M and Berget, SM** (1990).
Effect of 5' splice site mutations on splicing of the preceding intron.
Mol Cell Biol. **10**: 6299-6305.
- Tommerup, N and Nielsen, F** (1983).
A familial reciprocal translocation t(3;7)(p21.1;p13) associated with the Greig polysyndactyly-craniofacial anomalies syndrome.
Am J Med Gen. **16**: 313-321.
- Topf, KF, Kletter, GB, Kelch, RP, Brunberg, JA and Biesecker, LG** (1993).
Autosomal dominant transmission of the Pallister-Hall syndrome.
J Pediatr. **123**: 943-946.
- Ventruoto, V, Theo, G, Celona, A, Fioretti, G, Papagano, L, Stabile, M and Cavaliere, ML.** (1980).
A and B postaxial polydactyly in two members of the same family.
Clin Genet. **18**: 342-347.
- Villaviciencio, EH, Walterhouse, DO and Innaccone, PM** (2000).
The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease.
Am J Med Genet. **67**: 1047-1054.
- Vortkamp, A, Heid, C, Gessler, M and Grzeschik, K-H** (1995 a).
Isolation and characterisation of a cosmid contig for the GCPS gene region.
Hum Genet. **95**: 82-85.
- Vortkamp, A, Gessler, M and Grzeschik, K-H** (1995 b).
Identification of optimized target sequences for the GLI3 zinc finger protein.
DNA and Cell. Biol. **14**: 629-634.

Wagner, K, Kroisel, PM and Rosenkranz, W (1990).

Molecular and cytogenetic analysis in two patients with microdeletions of 7p and Greig hemizygoty for PGAM2 and TCRG genes.

Genomics **8**: 487-491.

Wang ; B, Fallon, JF and Beachy, PA (2000).

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

Cell **100**: 423-434.

Wild, A, Kalff-Suske, M, Vortkamp, A, Bronhold, D, König, R and Grzeschik, K-H (1997).

Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome.

Hum Mol Genet. **6** : 1979-1984

Williams PG, Hersh JH, Yen FF, Barch MJ, Kleinert HE, Kunz J, Kalff-Suske M. (1997).

Greig cephalopolysyndactyly syndrome: altered phenotype of a microdeletion syndrome due the presence of a cytogenetic abnormality.

Clin Genet. **52**: 436-441.

Wessling, M (2001).

Funktionelle Analysen von Genen (Gli), die an der Gliedmaßenentwicklung beteiligt sind.

Dissertationsarbeit am Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg.

Zaho, H, Tian, Y, Breedveld, G, Huang, S, Zou, Y, Chai, J, Li, M, Oostra, BA, HY Lo, W and Heutnik, P (2002).

Postaxial polydactyly type A/B (PAP-A/B) is linked to chromosome 19p13.1-13.2 in a chinese kindred.

Eur J Hum Genet. **10**: 162-166.

7. Abkürzungen

A	Adenin
AA	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinder-Serum-Albumin)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
dNTP	2'Desoxynukleosid-5'Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGFR</i> -Gen	Epidermal Growth Factor Receptor-Gen
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
kb	Kilobasenpaare
Mb	Megabasenpaare
MIM	Identifikationsnummer im Katalog der menschlichen Gene und Erbkrankheiten (MIM= Mendelian Inheritance in Man)
min	Minute
mV	Milivolt
n	Stichprobenumfang
nm	Nanometer
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
P	Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms
PCR	Poymerase chain reaction= Polymerase Kettenreaktion
q	Bezeichnung für den langen Arm des Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-Docedylsulfat
SSCA	Single strand conformation analysis= Einzelstrang-Konformations-Analyse
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquatus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen-diamin

Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Upm _{max}	Maximale Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
% v/v	Volumenprozent
Wt	Wildtyp
% w/v	Gewichtsprozent

Standardabkürzungen, die gemäß den Autoreninformationen des European Journal of Biochemistry ohne Definition gebraucht werden können, sind nicht angegeben.

Bemerkungen zur genetischen Nomenklatur:

Alle Bezeichnungen, die sich auf die Gene der erwähnten Spezies beziehen, werden kursiv geschrieben, während die Proteinbezeichnungen keine gesonderte Schreibweise zeigen. Für das humane System gilt, dass sowohl Gen als auch Protein mit Großbuchstaben geschrieben werden, während bei den übrigen Vertebraten diese Komponenten nur mit Großbuchstaben beginnen. Im Invertebratensystem gilt die grundsätzliche Kleinschreibung aller Gene und Proteine.

8. Anhang

8.1 Primersequenzen

Exon	Größe des Exons in bp	Primer	5'-3'-Sequenz der Primer	Länge der Amlicons in pb	Position in cDNA bzw. Intronsequenz
II	166	ExIIfor1	AGA TGA CAG GTG AAG TGG AC	211	5' Intron
		ExIIrev1	CTC GCT CAC ATC TGT TCG AGT G		bis nt 93
		ExIIfor2	GAA GAC ATC ATG GAG GCC CAG	217	ab nt-10
		ExIIrev2	CGC TCA ATT CAC AAG GAA TGA		3' Intron
III	243	ExIIIfor1	CGA GAA TGA GAC CTA ATT G	293	5' Intron
		ExIIIrev1	GGA CCC ATG GAT CTC TTT C		bis nt 333
		ExIIIfor2	ATG CAG CCA CAG AAT GTC C	185	ab nt 224
		ExIIIrev2	CCA TAC CTC CTG AAC AAG TG		3' Intron
IV	106	ExIVfor	GTT GCT TTG TGA ATC GGA ATG	226	5' Intron
		ExIVrev	AGC CAG CAT CTC GTT CCA TTT C		3' Intron
V	206	ExVfor1	GAG ACA GCC ATA GCC TGT G	215	5' Intron
		ExVrev1	GAG CGG ATA TAG TCC ATG TAG		bis nt 617
		ExVfor2	CTA CGT ATC CGG ACC TGC	228	ab nt 497
		ExVrev2	AGG AGG CTG CAT GAT CTC		3' Intron
VI	147	ExVIfor	GAC TCT GAG ATG CCT CAA GA	264	5' Intron
		ExVIrev*	GCC ATT TCC CAA GAC TC		3' Intron
VII	202	ExVIIfor1	TGG TAT AGA GTC CAA CTG CA	215	5' Intron
		ExVIIrev1*	GCT GAA GAG CTG CTA CGG		bis nt 989
		ExVIIfor2	GTC CAT ATC ACC ACT CTC CG	205	ab nt 901
		ExVIIrev2	GCA AAC AAG TGC TGA CAT TA		3' Intron
VIII	214	ExVIIIfor1	GTG TAC TTG TCT GAG CTC AGC	248	5' Intron
		ExVIIIrev1	CTG GAA TAG GCC TCT GTG TTG G		bis nt 1183
		ExVIIIfor2	CTC TCT CCA CAT GCA TCA GCA	216	ab nt 1065
		ExVIIIrev2	CAA CTG ACG TGG TGG CCT GC		3' Intron
IX	114	ExIXfor	TGC CCG AGT CAA GG	265	5' Intron
		ExIXrev	GAC CCA AAG ACA CCA GTC TTG		3' Intron
X	141	ExXfor	CCT CCT GTT GTG TCT GAT TC	247	5' Intron
		ExXrev	GTC ACA GAG CTG TAA AGC TCG G		3' Intron
XI	150	ExXIfor*	TGA TGA ATA CGT TTC CAT TTG	231	5' Intron
		ExXIrev*	AAG GAC CCA AGT GTG CCT G		3' Intron
XII	164	ExXIIfor	CGT GTT AGG CAT AAG CTG CTG	265	5' Intron
		ExXIIrev*	CCT TAT GCA AGC TCC ATG CC		3' Intron
XIII	292	ExXIIIfor1	CTT TTG GGA TGG GGC ATA GTC	246	5' Intron
		ExXIIIrev1*	GAC CTG GAC TGT GAA TGG CTG		bis nt 1991
		ExXIIIfor2	GCC CAG AGG CTG ATG TCA CC	243	ab nt 1898
		ExXIIIrev2	GGC CTG CTG TGA AGT CAG AAG		3' Intron
XIV	328	ExXIVfor1	CTT GAG CTC TCA TTA TTG GCT	239	5' Intron
		ExXIVrev1	GTG GAA ATG GTT GAG TCC ATG		bis nt 2267
		ExXIVfor2	CAT CAG CAA CTA TTC CAA CAG	223	ab nt 2157
		ExXIVrev2	CTA TGA GAG GAG AGA CCG CAG		bis nt 2425

		ExXIVfor3	CGGCAG GGA CCA AAT GGA TG	223	ab nt 2306
		ExXIVrev3	GGA CTG GTG GAG AAA CTA GC		3' Intron
XV	257	ExXVfor1	GTG TAA GTC ATG CTC GAA GGG	198	5' Intron
		ExXVrev1	GAG CTG ATG GTG CTG GCG C		bis nt 2567
		ExXVfor2	CAA CAC CTG CAG CTT GGG TG	224	ab nt 2445
		ExXVrev2	CTC ACG TTC TGC GGC CGG C		bis nt 2669
		ExXVfor3	GCA GCC GCC GCT CCT CAG G	214	ab nt 2792
		ExXVrev3	CAG GCC AGG CTC GAG GGC		bis nt 2691
		ExXVfor4	ACT CCT ACG ACC CCA TCT C	213	ab nt 2691
		ExXVrev4	ATG AAC TGG AGG CAG GGC		bis nt 2904
		ExXVfor5	CAA CAT GGA GAG GAT GAG C	228	ab nt 2793
		ExXVrev5	TGA AGC GCG GCA CAC GAG		bis nt 3021
		ExXVfor6	CCG AGG AGG TGC AGC GAC G	228	ab nt 2963
		ExXVrev6	GCC GCG TGT AAT TCT GAA GCA C		bis nt 3154
		ExXVfor7	CTC GTG TGC CGC GCT TCA G	238	ab nt 3056
		ExXVrev7	CTG CAC CAC GTC GTC CGG C		bis nt 3294
		ExXVfor8	CAG CAT CAC CGA GAA CGT CAC	262	ab nt 3201
		ExXVrev8	TGC TGC CCT CGG GGC AGG		bis nt 3463
		ExXVfor9	CCA CGG GCC CGG TGA CTT TG	262	ab nt 3369
		ExXVrev9	CAG CAG GCC CGC TCC TCA AG		bis nt 3631
		ExXVfor10	CAA GTG TGG GCC GCG GCC	254	ab nt 3531
		ExXVrev10	GGC TGC CTG TTG AGA CAG TTC		bis nt 3785
		ExXVfor11	CTT GAT GCT CCA CAA CAG CC	243	ab nt 3684
		ExXVrev11	CAC CAT GCT GCC AGC TGA CTC		bis nt 3927
		ExXVfor12	GCC TCA AAG CTG AAG AGC AC	244	ab nt 3832
		ExXVrev12*	CTT GGT AGA TGT TGA TGT GTG		bis nt 4075
		ExXVfor13	CGA CAG CAT GCA GCA CCC	271	ab nt 3997
		ExXVrev13	CAT TCA CCC TGC AGG TCT G		bis nt 4258
		ExXVfor14	CAG CCA TGT GCC AGC TTTG	260	ab nt 4150
		ExXVrev14	CTG TAG CAG GCA GCT GGC G		bis nt 4410
		ExXVfor15*	CTA TGA CCA AAC CGT GGG C	261	ab nt 4329
		ExXVrev15	GTT CTG AAT GAT ACT TGG GC		bis nt 4590
		ExXVfor16	GGT ACA GAT TGA CTT CGA TGC	276	ab nt 4503
		ExXVrev16*	GAT TTC CGT TGG TTG CAG TC		bis nt 4779
		ExXVfor17	GAG TTC TTT GCT GAC CTC	247	ab nt 4687
		ExXVrev17	CTC CCT AGA ATA CTT TAG GG		3' untranslatierte Region

Tabelle 8.1: Primersequenzen für die Amplifikation der GLI3-Exons

Die Tabelle enthält die Sequenzen für die Primer der Amplifikation der translatierten Exons des GLI3-Gens. Die Vorwärtsprimer tragen den Zusatz 'for', die Rückwärtsprimer den Zusatz 'rev', im Namen. Die Sequenz ist jeweils in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die jeweilige Position des ersten und/oder letzten Nukleotids der Amplicons in der cDNA sind aufgelistet. Primer, die aus dem 5' bzw. dem 3' gelegenen Intronsequenzen stammen, sind gesondert als solche ausgewiesen.

8.2 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name	Stephanie Josephine Driess
Geburtsdatum und Ort	05.10.1975, Bad Bergzabern
Adresse	Chemin des Perettes 19 CH-1024 Ecublens, Suisse
Familienstand	ledig

Berufliche Stellung:

10/2004	Assistenzärztin am Hopital de Rolle; Suisse
---------	---

Akademische Ausbildung:

1995-1997	Betriebswirtschaftslehre an der Universität Bayreuth; Abschluss Vordiplom
1997-2004	Studiengang Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg: Physikum 9/1999 1. Staatsexamen 8/2000 2. Staatsexamen 4/2003
04/2003-03/2004	Praktisches Jahr 3. Staatsexamen 6/2004

Famulaturen:

2/2000- 3/2000	Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Südliche Weinstraße Bad Bergzabern
3/2001- 4/2001	Chirurgie, Kreiskrankenhaus Frankenberg
8/2001- 9/2001	Gynäkologie und Geburtshilfe, Diakonie-Krankenhaus Marburg
2/2002- 3/2002	Kinder- und Jugendpsychiatrie, Universitätsklinikum Marburg
8/2003- 9/2003	Innere Medizin, Praxis Dr. Fehmann, Marburg

Schulbildung:

1982-1886	Felsenland-Grundschule Wieslautern
1986 – 1995	Gymnasium Bad Bergzabern (bilingualer Schulzweig)

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität zu Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Arnold; Aumüller; Barth; Basler; Baum; Bertalafany; Bien; Bolm; Cetin; Christiansen; Czubayko; Daut; Feuser; Fruhstorfer; Geuss; Gotzen; Griss; Grzeschik; Happle; Hasilik; Hellinger; Hesse; Hofmann; Kaiser; Kern; Klenk; Kleine; Klose; Koch; Koolman; Kretschmer; Krieg; Kuhn; Lang; Lange; Maisch; Moll; Moosdorf; Mueller; Neubauer; Oertel; Rehder; Remschmidt; Röhm; Rothmund; Schäfer; Schmidt; Schnabel; Schüffel; Seitz; Seyberth; Slenczka; Steininger; Suske; Vohland; Weihe; Werner; Westermann; Wilhelm

8.4 Danksagung

Zum Schluss sei all denen gedankt, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt, gefördert, beraten und begleitet haben. Sie alle haben, jeder auf seine Weise, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen:

Herrn Professor Dr. K.-H. Grzeschik für die Vergabe des interessanten Themas, produktive und kritische Ratschläge und seinem Interesse an dem Verlauf dieses Projektes.

Dr. Martha Kalff-Suske, für die wissenschaftliche Begleitung dieser Arbeit, eine hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Kalff-Suske die zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Ein besonderer Dank an Dorothea, die mich geduldig durch die Schwierigkeiten des Laboralltages begleitet hatte.

Ein besonderer Dank an meine Eltern, die mich immer interessiert begleitet haben, die mir immer Rat geben konnten, Sorgen zu mildern wussten und immer an meiner Seite waren, wenn ich ihre Hilfe benötigt habe.

Tiefer Dank gebührt Jörg, meinem zukünftigen Ehemann, der sich mit unendlicher Geduld nicht nur mit den tausenden Textfeldern dieser Arbeit auseinandergesetzt, sondern der mich vor allen Dingen durch praktische und psychologische Unterstützung treu begleitet hat. Schade, dass dafür kein Ehrendokortitel verliehen werden kann, er hätte ihn verdient.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die beim Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Punktmutationsanalysen bei GLI3-assoziierten Krankheitsbildern: Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom, Pallister-Hall-Syndrom und isolierte Polydaktylien“

im Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg- unter der Leitung von Prof. Dr. K.-H. Grzeschik mit Unterstützung durch Dr. M. Kalff-Suske ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um die Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde zum Teil unter folgendem Titel und in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

***American Journal of Medical Genetics* 2003; 120A: 49-58**

“Variable phenotype in Greig Cephalopolysyndactyly Syndrome: Clinical and radiological findings in 4 independent families and 3 sporadic cases with identified GLI3 mutations.”

***Human Genetics* 2003; 112: 103**

“Gene symbol: GLI3

Disease: Greig Cephalopolysyndactyly syndrome”

***Human Genetics* 2003; 112: 103**

“Gene symbol: GLI3

Disease: Pallister-Hall syndrome”

Lausanne, den 26.08.05