

Aus dem Institut für Allgemeine Humangenetik
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik

**Funktionelle Analysen von Genen (*GLI*),
die an der Gliedmaßenentwicklung beteiligt sind**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Martina Wessling
aus Rhede / Kreis Borken

Marburg, August 2001

Angenommen von Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 05.02.2002

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold

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

Koreferent: Prof. Dr. J. Hebebrand

Es gibt keine Wissenschaft ohne Phantasie

und keine Kunst ohne Tatsachen.

Vladimir Nabokov

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Einführung zur embryonalen Entwicklungsgeschichte und Gliedmaßenentwicklung	1
1.2 Molekulare Grundlagen der Gliedmaßenentwicklung	3
1.2.1 Die Determination der dorso-ventralen (D/V) Achse bei der Gliedmaßenentwicklung	6
1.2.2 Die Determination der proximo-distalen (P/D) Achse bei der Gliedmaßenentwicklung	7
1.2.3 Die Determination der antero-posterioren (A/P) Achse bei der Gliedmaßenentwicklung	8
1.3 Die hedgehog (hh)-Signalkaskade und die Rolle der beteiligten Faktoren	9
1.3.1 Abwesenheit des hedgehog-Signals im anterioren Bereich	12
1.3.2 Anwesenheit des hedgehog-Signals im anterioren Bereich	14
1.4 Das Hedgehog-Signal im Vertebratensystem: Konservierung von Faktoren	18
1.4.1 Mitglieder der <i>Drosophila</i> hedgehog-Kaskade werden bei Vertebraten durch Genfamilien repräsentiert	18
1.4.2 Die <i>GLI</i> -Genfamilie beim Menschen	20
1.4.3 Funktionelle Gemeinsamkeiten zwischen humanem GLI3 und cubitus interruptus	21
1.5 Homologe der Hedgehog-Signalkaskade beim Menschen: Bedeutung bei genetisch bedingten Entwicklungsstörungen und Erkrankungen	24

1.5.1	Beteiligung von <i>GLI3</i> und seiner Genfamilie an der Entstehung von Fehlentwicklungen und Erkrankungen	26
1.6	Zielsetzung der Arbeit	29
2.	Materialien und Methoden	32
2.1	Materialien	32
2.1.1	Chemikalien	32
2.1.2	Enzyme und DNA-Größenstandards	32
2.1.3	Medien, Nährböden und Standardlösungen	33
2.1.3.1	Nährmedien und Lösungen für die Bakterienkulturen	33
2.1.3.2	Nährmedien und Lösungen für die Zellkulturen	34
2.1.3.3	Standardlösungen und Puffer	36
2.1.4	Organismen	37
2.1.4.1	Bakterienstämme	37
2.1.4.2	Zelllinien	38
2.1.5	Plasmide und Expressionskonstrukte	39
2.1.6	Oligonukleotide	43
2.1.7	Verwendete Fertigsysteme	48
2.1.7.1	DNA-Präparations- und Aufreinigungssysteme	49
2.1.7.2	Antikörper	49
2.1.8	Geräte und Zubehör	50
2.2	Standardmethoden	52
2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
2.2.2	DNA-Präparation und Reinigung	53
2.2.2.1	Minipräparation von Plasmid-DNA mit QIAprep Spin Kit	53
2.2.2.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	54
2.2.2.3	Phenolextraktion	54
2.2.3	Präzipitation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	55
2.2.4	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA	55
2.2.5	Gelelektrophoresen	55

2.2.5.1	Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	55
2.2.5.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
2.2.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Gelen	56
2.2.6.1	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	56
2.2.6.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelen	57
2.2.7	Klonierungen	57
2.2.7.1	Dephosphorylierung linearisierter DNA	58
2.2.7.2	Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden	58
2.2.7.3	Abbau von 3'-überhängenden Enden	58
2.2.7.4	Ligation von DNA-Fragmenten	59
2.2.8	Kompetente Zellen und Transformation	59
2.2.8.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> SG 13009 [pRep4] Bakterien	59
2.2.8.2	Transformation von <i>E. coli</i>	60
2.2.9	Kultur von <i>Escherichia coli</i>	61
2.3	Zellbiologische Methoden	61
2.3.1	Kultivierung von Zellen	61
2.3.1.1	Auftauen	61
2.3.1.2	Passagieren	62
2.3.1.3	Einfrieren und Lagerung	62
2.3.2	Transiente Transfektion	63
2.3.2.1	Liposomen-vermittelte Transfektion	63
2.3.2.2	„Effectene“-vermittelte Transfektion	64
2.3.3	Gewinnung von Zellextrakten	65
2.3.3.1	Gewinnung von Gesamtzellextrakten	65
2.3.3.2	Gewinnung von Kernextrakten	66
2.3.4	Messung der Aktivität von Reportergenen	68
2.3.4.1	Dual Luciferase Reporter Assay	68
2.4	Proteinbiochemische Methoden	70

2.4.1	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	70
2.4.2	Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit Coomassie-Blau	73
2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford und Lowry	73
2.4.4	Expression eukaryotischer Gene in <i>E. coli</i>	74
2.4.5	Isolierung und Reinigung von Einschlußkörperchen nach Nagai <i>et al.</i> , 1985	75
2.4.6	Isolierung und Reinigung von Einschlußkörperchen nach Kadonaga <i>et al.</i> , 1987	76
2.4.7	Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot, „Semidry-Verfahren“, Teil 1)	77
2.4.8	Gelretardierungsexperimente	78
2.4.8.1	Hybridisierung und Markierung der Oligonukleotide	79
2.4.8.2	Bindungsreaktion und Detektion der Protein-DNA-Komplexe	79
2.5	Immunologische Methoden	81
2.5.1	Herstellung polyklonaler Antiseren	81
2.5.2	Aufreinigung der IgG-Antikörper aus Kaninchenserum mit Hilfe von Protein-A-Sepharose	81
2.5.3	Immundetektion von Proteinen (Western Blot, Teil 2)	82
2.5.4	Immunhistochemischer Nachweis von rekombinanten Proteinen nach Transfektion bzw. endogen exprimierten Proteinen	85
2.5.4.1	Immunhistochemischer Nachweis von rekombinanten GFP-Fusionsproteinen in transfizierten Zellen	85
2.5.4.2	Immunhistochemischer Nachweis von endogen exprimierten Proteinen in transient transfizierten Zellen	86
2.6	Sequenzierung	87
2.6.1	Sequenzierung von Plasmid-DNA	88
2.6.2	Aufreinigung der Sequenzansätze	89

2.6.3	Sequenzierung von PCR-Produkten	89
2.6.3.1	Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung	90
2.6.4	Auswertung der Sequenzanalysen	91
2.7	Gerichtete Mutagenese	91
2.8	Sicherheitsmaßnahmen	93
3.	Ergebnisse	94
3.1	Herstellung polyklonaler Antiseren gegen den Transkriptionsfaktor GLI3	94
3.1.1	Klonierung und bakterielle Expression von GLI3-Proteindomänen	94
3.1.2	Aufreinigung der rekombinanten Proteine	96
3.1.3	Gewinnung und Aufreinigung polyklonaler Antiseren gegen den N-terminalen und C-terminalen Bereich von GLI3	97
3.2	DNA-Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors GLI3	99
3.2.1	Gelretardierungsexperimente mit Wildtyp-GLI3 aus Zell-extrakten	100
3.2.2	Bindungsstudien mit rekombinanten GLI3-Zinkfinger-Peptiden	102
3.2.2.1	Mutationen im Zinkfingerbereich können die DNA-Bindungsfähigkeit des GLI3-ZF-Peptids beeinflussen	102
3.3	Einfluß von Mutationen in GLI3 auf die Fähigkeit dieses TF7 zur Aktivierung oder Repression von Genen	107
3.3.1	Transaktivierende Wirkung von TA ₁ in einem GAL4-Fusionsprotein wird nicht durch die Mutation S1526G beeinflusst	107
3.3.2	Einfluß des Wildtypproteins und ausgewählter GLI3-Mutanten auf die Transkription eines Reporters mit artifiziellen GLI-Bindungsstellen	109

3.3.3	Einfluß von GLI3-Mutanten auf die Konkurrenz von GLI1 und GLI3 um gleiche Reporterbindungsstellen	114
3.3.4	Konservierte Sequenzbereiche im Aminoterminus von GLI3 mit noch unbekannter Funktion	116
3.3.5	Transaktivierende Wirkung von GLI3-Mutanten auf den natürlichen Promotor eines Zielgens	119
3.4	Einfluß von GLI3-Deletionen auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins	121
3.4.1	N- und C-terminale GLI3-Deletionskonstrukte mit GFP	121
3.4.2	Unterschiedliche GLI-Homologiedomänen beeinflussen die subzelluläre Lokalisation der GLI3-GFP-Fusionsproteine	124
3.4.3	Untersuchung der Assoziation von GLI3 mit Zytoskelettstrukturen	130
3.5	Regulation von GLI3 über posttranslationale Proteinmodifikationen	134
3.1.2	Nachweis exprimierter GLI3-GFP-Fusionsproteine nach transienter Transfektion	134
3.1.3	Induzierte GLI3-Phosphorylierung	137
4.	Diskussion	140
4.1	Die Sonic Hedgehog (SHH) – GLI3 Signalkaskade: Embryogenese und Entstehung von Erkrankungen beim Menschen	140
4.2	DNA-Bindung des GLI3-Proteins bei Gelretardierungsexperimenten	143
4.3	GLI3 Zinkfinger-Peptid und ihre DNA-Bindungsfähigkeit	145
4.4	Regulation der GLI-DNA-Interaktion außerhalb der Zinkfinger-Domäne	148

4.5	Die GLI-Transkriptionsfaktoren und ihre Aktivierungs- bzw. Repressionsfähigkeit	149
4.5.1	TA ₁ (Transaktivierende Domäne 1) in GLI3 ist trotz Mutation S1526G unverändert aktiv	149
4.5.2	Transkriptionelle Aktivität von GLI1- und GLI3-Wildtypprotein und ausgewählten GLI3-Mutanten	151
4.5.3	Kompetition der GLI-Proteine um gleiche Reportergenbindungsstellen	154
4.5.4	Im GLI3-N-Terminus konservierte Sequenzbereiche können eine funktionelle Bedeutung haben	156
4.5.5	Wirkung von exprimierten GLI-Proteinen auf einen natürlichen Promotor	159
4.6	Die subzelluläre Lokalisation von GLI3	161
4.6.1	Die subzelluläre Verteilung von cubitus interruptus als Modell für GLI3	161
4.6.2	Die subzelluläre Verteilung von GLI3-GFP-Fusionsproteinen wird durch unterschiedliche GLI-Homologie-domänen beeinflusst	163
4.6.3	Fusionsproteine aus Gesamt-GLI3 und GFP zeigen keine Kolokalisation mit Strukturen des Zytoskeletts	170
4.7	Posttranslationale Modifikation des GLI3-Proteins	172
4.7.1	Transfizierte GLI3-GFP-Fusionsproteine sind unverändert nachweisbar	173
4.7.2	Phosphorylierung als kritischer Parameter bei den GLI3-Modifikationsprozessen?	175
4.8	Ausblick	177
5.	Zusammenfassung	179
6.	Literaturverzeichnis	182
7.	Lebenslauf	194

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer	197
9. Danksagung	198
10. Ehrenwörtliche Erklärung	200

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
aa	amino acids (Aminosäuren, Position im Protein)
Abb.	Abbildung
a.d.	aqua dest (destilliertes H ₂ O)
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar (e)
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Chloramp	Chloramphenicol
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
cfu	colony forming units (koloniebildende Einheiten)
Ck	Cytokeratin
cpm	counts per minute
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	desoxy-
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
dd	didesoxy-
ddFors	didesoxy-Forskolin
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2' Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
Fc	Fragment, constant; Bereich eines Antikörpers, der durch seine schweren Ketten gebildet wird
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyant
Fors	Forskolin
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescence Protein

h	Stunde
Hek	human embryonic kidney cells (humane embryonale Nierenzellen)
Hepes	2-(4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare bzw. Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KO	knock out
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
mb	Megabasenpaare bzw. Megabasen
MIM	Identifikations-Nummer im Katalog der menschlichen Gene und Erbkrankheiten (MIM = Mendelian Inheritance in Man; McKusick <i>et al.</i> , 1994)
min	Minuten
$\mu\text{l} / \mu\text{g} / \mu\text{M}$	Mikroliter / Mikrogramm / Mikromolar
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
Mt	Mutante
mV	Millivolt
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
p	Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:23:1), (v/v/v)
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentium hydrogenii
PS	Penicillin / Streptomycin
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rpm _{max}	Maximale Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	sodium dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SSCA	single strand conformation analysis (Einzelstrangkonformationsanalyse)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-HCl/EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
(v/v)	volume to volume (Volumen/Volumen)
Wt	Wildtyp
(w/v)	weight to volume (Gewicht/Volumen)
(w/w)	weight to weight (Gewicht/Gewicht)
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
ZF / ZnF	Zinkfinger
ZNS	Zentrales Nervensystem

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (Internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt. Aminosäuren wurden mit dem international gebräuchlichen Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt. Standardabkürzungen, die gemäß den Autoreninformationen des European Journal of Biochemistry ohne Definition gebraucht werden können, sind nicht grundsätzlich 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.

1. Einleitung

1.1 Einführung zur embryonalen Entwicklungsgeschichte und Gliedmaßenentwicklung

Das Studium der Embryologie dient dazu, sich mit den Erkenntnissen der Organisation eines Lebewesens vertraut zu machen. Schon zu Zeiten des griechischen Philosophen Aristoteles (384-322 vor Christus) waren die Menschen daran interessiert, zu erfahren, wie ein Embryo heranwächst. Dazu wurden Fenster in die Schalen von Hühnereiern gestanzt, wodurch zu beobachten war, wie sich ein Embryo zum Küken entwickelt. Dieses Verfahren wird seit über 100 Jahren von den modernen Embryologen genutzt, um mittels des Fensters Manipulationen am Hühnerembryo durchzuführen, deren Auswirkungen nach Beendigung der Entwicklung beobachtet werden können. Neben dem Hühnchen (*Gallus gallus*) gibt es noch andere Modelorganismen, wie z. B. die Maus (*Mus musculus*) oder die Taufliege *Drosophila melanogaster*, deren Studium dazu beitragen kann, die Geheimnisse der Entwicklungsgeschichte zu lüften. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse machen deutlich, daß die Embryogenese nicht nur durch die Wirkung von Faktoren, die in einer festgelegten zeitlichen Abfolge vorhanden sind, bestimmt werden. Vielmehr ist es die Interaktion dieser Faktoren untereinander in einem spezifischen zeitlichen Rahmen, die die Entwicklung der Organismen bestimmt. Tierexperimentelle Untersuchungen, wie bereits oben erwähnt, und auch der Vergleich von Entwicklungsvorgängen verschiedener Lebewesen können helfen, die Entwicklung des menschlichen Individuums zu verstehen. Oft sind es gerade die Abweichungen von den grundsätzlichen Vorgängen, die einen Einblick in die geregelten Gesetzmäßigkeiten der Embryologie gewähren. Sowohl die spontan entstandenen (natürlichen Mutationen), als auch die durch Manipulation erzeugten, gerichteten Veränderungen (z. B. Einwirkung von ionisierenden Strahlen und Chemikalien, Entfernung oder Addition von Zellen und Geweben, Einfügen von Transgenen sowie „knock out“- und „knock in“-Mutationen) haben zusammen mit den bereits vorhandenen, theoretischen Kenntnissen in den letzten zwei Dekaden zu revolutionären Einsichten bezüglich der embryonalen Entwicklung geführt. Zum einen hat sich herausgestellt, daß im gesamten Tierreich, unabhängig von der Spezies, viele Strukturen mit vergleichbaren oder ähnlichen Funktionen durch die äquivalenten, oder zumindest verwandten Regulationsprozesse gebildet werden. Da

diese Prozesse über Gene und ihre Produkte determiniert werden, bedeutet, daß diese Strukturen durch den Einfluß von homologen oder verwandten Genen entstehen. Zum anderen konnte gezeigt werden, daß die gleichen Gene innerhalb der Embryonalentwicklung auch in unterschiedlichem Kontext wirken können. Damit wird vermittelt, daß Gene die Entwicklung von Gliedmaßen beeinflussen können und außerdem eine Rolle bei z.B. der Bildung des Nervensystems spielen. Offensichtlich greift die Natur immer wieder auf bewährte Mechanismen zurück und ist damit in der Lage, vollkommen unterschiedliche Strukturen und Organismen zu bilden (Wolpert, 1996; Riddle *et al.*, 1999).

Die Entwicklung der Gliedmaßen stellt bei der Anwendung dieser gleichen Mechanismen nur ein Beispiel dar. Die Festlegung der Polaritätsachsen, also die Determination von körpernah (proximal) und körperfern (distal), bauchseits (ventral) und rückenwärts (dorsal), kopfseits (anterior) und schwanzseits (posterior) wird auch hier, innerhalb verschiedener Spezies, zum größten Teil von den gleichen Signalen (Genprodukten) reguliert. Die Ausrichtung dieser drei räumlichen Achsen ist maßgeblich für die korrekte Anordnung der einzelnen Bestandteile der Gliedmaßen, wie z.B. Position und Integrität der einzelnen Finger, des Unterarms, des Oberarms, der Handinnen- und außenfläche (Abbildung 1). Der Vorgang, der zur Festlegung dieser Achsen und der dreidimensionalen Form der Körperanhängsel führt, ist spezifisch für die Gliedmaßenentwicklung. Er wiederholt sich aber in einer grundsätzlichen Form in allen Bereichen der Embryonalentwicklung und wird auch als „Musterbildung“ bezeichnet. Man kann ihn allgemein in vier aufeinanderfolgende Stadien unterteilen, wobei zu Beginn ein Bereich mit Zellen definiert werden muß, der den Ausgangspunkt für die Bildung einer gewissen Struktur darstellt. Danach werden Signalzentren innerhalb dieses Bereiches etabliert, die eine Positionsinformation aussenden. Häufig findet man diese in Form von sogenannten Morphogenen, Genprodukten mit einer polarisierenden Wirkung, die eine räumliche Position eindeutig determinieren. Haben die Informationen der einzelnen Signalzentren ihren Bestimmungsort erreicht, z. B. über Zell-zu-Zell Weiterleitung oder Diffusion durch den interzellulären Raum, kann das vierte und letzte Stadium dieses Prozesses beginnen. Die Positionssignale haben in den Zellen dieses Bereiches, die je nach Lage eine unterschiedliche Zusammenstellung von Informationen bekommen, zusätzliche Signalwege aktiviert, die das Schicksal von einzelnen Zellen oder aber Zellverbänden vor dem Hintergrund der Positionssignale bestimmen. Am Ende dieser komplexen Signalnetzwerke und den daraus resultierenden Reaktionen (z.B. Zellvermehrung, Zelldif-

ferenzierung, Zellmobilität und Zelltod) steht die Bildung der gewünschten Struktur, z.B. der Vordergliedmaßen, oder für den generellen Regulationsmechanismus die Entstehung eines neuen Organismus (Johnson *et al.*, 1997).

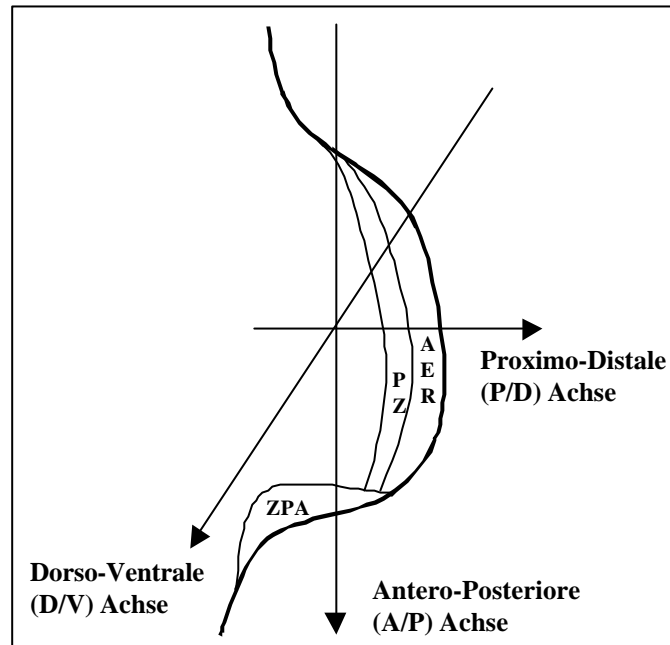


Abb. 1: Darstellung der Polaritätsachsen am Beispiel der Gliedmaßenentwicklung. Gezeigt ist die Schnittfläche exakt zwischen dem dorsalen und ventralen Anteil der sich bildenden Gliedmaßenknospe. ZPA (zone of polarizing activity; Polarisierungszone) und AER (apikale ektodermale Leiste; apikale ektodermale Leiste) bezeichnen die beiden Hauptsignalzentren der Gliedmaßenentwicklung. Der Progresszone (PZ; Wachstumszone) genannte Bereich, befindet sich direkt angrenzend zur AER und enthält undifferenzierte Mesenchymzellen (nach Manouvrier-Hanu *et al.*, 1999).

1.2 Molekulare Grundlage der Gliedmaßenentwicklung

Da sich die meisten Kenntnisse zu den molekularen Mechanismen der Gliedmaßenentwicklung bei den Wirbeltieren aus experimentellen Untersuchungen mit Hühner- und Mausembryonen ableiten, bilden diese die Grundlage der folgenden Ausführungen.

Die Gliedmaßen der Wirbeltiere bilden sich aus zwei Gewebekomponenten, dem Mesoderm der Somiten und dem benachbarten lateralen Mesoderm (Abbildung 2). Durch differenzierte Proliferation des seitlichen Gewebes auf Höhe der zukünftigen Gliedmaßenanlagen bildet sich am Embryo eine Ausstülpung, die auch als Gliedmaßenknospe

bezeichnet wird (Abbildung 3a). Bevor diese Anlage jedoch erscheint, hat sich mit Entstehung der zellulären Struktur der „zone of polarizing activity“ (ZPA; Polarisierungszone) durch frühe Signalmoleküle bereits die Determination der anterioren und posterioren Achse eingestellt (Johnson *et al.*, 1997; Innis *et al.*, 1998).

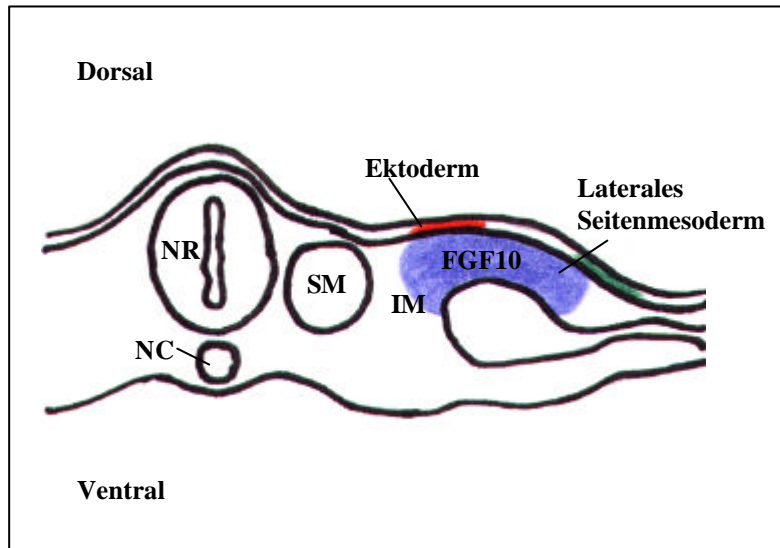


Abb. 2: Transversalschnitt durch einen Embryo im frühen Entwicklungsstadium auf Höhe der Somiten. Die blau schattierte Zone mit der FGF10-Expression innerhalb des Mesoderms bezeichnet die Region, aus dem sich das Mesenchym der Gliedmaßenknospe entwickelt, einschließlich des lateralen Seitenmesoderms und des intermediären Mesoderms (IM). Zellen, die das dorsale Gliedmaßenektoderm bilden (rot dargestellt), befinden sich näher am Neuralrohr (NR) als jene, die das ventrale Ektoderm (grün markiert) bilden. Zwischen diesen beiden Zellanteilen befindet sich der ektodermale Bereich (farblos), welcher sich später zur AER entwickelt. SM markiert das Mesoderm der Somiten und NC bezeichnet die Notochorda (nach Innis *et al.*, 1998).

Kurz nach dem Sichtbarwerden der Gliedmaßenknospe, an deren posterioren Rand sich die ZPA befindet, wandern dann Zellen von den nahegelegenen Somiten ein, aus denen sich später die gesamte Muskulatur der Körperanhänge bildet. Neben den Muskeln haben aber auch die Nerven und das Blutgefäßsystem ihren Ursprung außerhalb der Gliedmaßenanlage, während das vom Skelett abstammende Mesenchym, die Knorpel und Sehnen aus dem für diese Strukturen spezifischen, seitlichen Mesenchym stammen (Abbildung 3b). Die zur Gliedmaßenentwicklung bestimmte Ausstülpung des Mesoderms ist außen von Ektoderm umgeben, das sich an der distalen Spitze zu spezialisieren beginnt. Diese spezialisierte Struktur bildet nach weiterer Proliferation einen verdickten epithelialen Bogen, auch „apical ectodermal ridge“ (AER) genannt, der als Leiste entlang der anterior-posterioren Achse verläuft. Diesem Signalzentrum wird eine ent-

scheidende Rolle beim weiteren Auswachsen der Gliedmaßenanlage und damit der Festlegung der proximo-distalen Achse zugesprochen (Cohn *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997). Es überdeckt nur die äußerste Spitze der Ausstülpung und liegt genau an der Grenzfläche des als ventral und dorsal determinierten Gewebes. Kurz nach Etablierung des AER, finden im direkt proximal dazu gelegenen Mesenchym Aggregationen statt, die zu knorpelartigen Vorläufern des Gliedmaßenskelettes weiter modelliert werden. Das der AER direkt angrenzende Mesenchym bleibt allerdings undifferenziert und wird als Proliferationszone (progress zone, PZ) bezeichnet. Die von der AER entsandten Signale induzieren fortlaufend die mitotische Aktivität der PZ, so daß das proliferierende Gewebe eine Ressource für die voranschreitende Musterbildung darstellt, die proximal zuerst die humeralen, dann radialen und ulnaren und zum Schluß die Knorpelvorläufer umfaßt. Das Zusammenwirken von AER, ZPA und PZ machen die Gliedmaßenknospe zu einer unabhängigen Domäne, die ihre Organisation eigenständig determiniert.

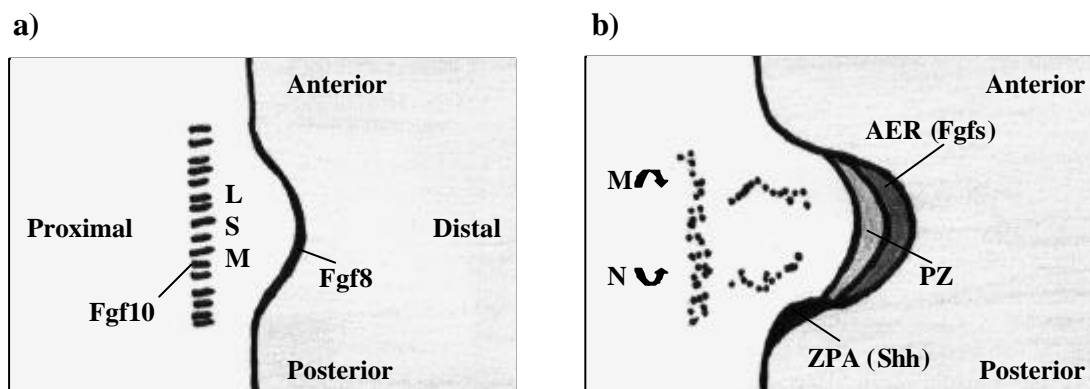


Abb. 3: Schematische Darstellung der Entstehung einer Gliedmaßenknospe. a) Im frühen Stadium der Knospenbildung ist lediglich eine kleine Ausstülpung von mesodermalem Gewebe (LSM, laterales Seitenmesoderm) zu erkennen, welches eine Expression des Fibroblastenwachstumsfaktors 10 zeigt. Die Anwesenheit von Fgf10 ist ausreichend, um im undifferenzierten Ektoderm die Expression des Familienmitgliedes Fgf8 zu induzieren. b) Die frühen Signalmoleküle haben zur Ausbildung einer vollständigen Gliedmaßenknospe geführt. Die apikale ektodermale Leiste (AER) hat sich entlang der antero-posterioren Achse des Knospenektoderms etabliert und sendet weiter Signalmoleküle der Fgf-Familie aus, wodurch die Mitose in der anschließenden Proliferations- oder Wachstumszone (PZ) stimuliert wird. Die ZPA liegt als zweites großes Signalzentrum im posterioren Mesenchym und exprimiert das Morphogen Sonic hedgehog (Shh), das die antero-posteriore Achse determiniert. Zu diesem Zeitpunkt beginnen neuronale (N) und muskuläre (M) Vorläuferzellen in die Gliedmaßenknospe einzuwandern (nach Innis *et al.*, 1998).

1.2.1 Die Determination der dorso-ventralen (D/V) Achse bei der Gliedmaßenentwicklung

Die Spezifikation der Polaritätsachse zwischen dem dorsalen und ventralen Gewebe ist mit der Bildung und Positionierung des AER assoziiert, aber es handelt sich um getrennte Mechanismen. Die kritischen Signale für die Achsenfestlegung sind auch hier, ähnlich wie im anterior-posterioren Bereich, schon lange bevor morphologisch eine Gliedmaßenknospe zu erkennen ist vorhanden (Altabef *et al.*, 1997; Michaud *et al.*, 1997). Bestimmt wird die Festlegung von dorsal und ventral durch den ektodermalen Bereich, der das Gebiet um die Knospenbildung überlagert und zuvor Positionsinformationen aus dem Mesoderm erhalten hat. Dabei geht man von einer Zweiteilung des Ektoderms aus, wobei die dorsale Domäne das Gebiet um die Somiten überdeckt und sich bis zur Mitte der seitlichen Platte des Embryos erstreckt. Der ventrale Anteil dehnt sich dann weiter lateral aus. Vier Gene sind bisher bekannt, die entlang dieser Achse differentiell exprimiert werden. *Engrailed-1* (*En-1*) wird allein im ventralen Ektoderm exprimiert, während die sekretierten Faktoren *Radial fringe* (*r-Fng*) und *Wnt-7a* im dorsalen Ektoderm exprimiert werden. Das LIM-Homeodomänen Protein *Lmx-1* ist als dorsaler Faktor des Mesoderms bekannt. *Wnt-7a* repräsentiert das dorsale Signal im Ektoderm, das die Expression von *Lmx-1* im dorsalen Mesenchym ermöglicht. Gleichzeitig wird die Expression von *Wnt-7a* über den ventralen Faktor *En-1* in dieser Domäne reprimiert, so daß beide zusammen die *Lmx-1*-Expression auf das dorsale Mesenchym beschränken und damit die dorsale Musterbildung garantieren. Gleichzeitig hat *En-1* aber auch die Funktion, *r-Fng* auf das dorsale Ektoderm zu beschränken, wodurch eine deutliche ventrale Grenze entsteht (Abb. 4). Das Zusammenspiel dieser beiden Proteine hat offensichtlich einen entscheidenden Einfluß auf die Positionierung der AER, nicht aber auf seine Entstehung, denn dazu werden mesenchymale Signalmoleküle benötigt (Johnson *et al.*, 1997; Catala, 2000).

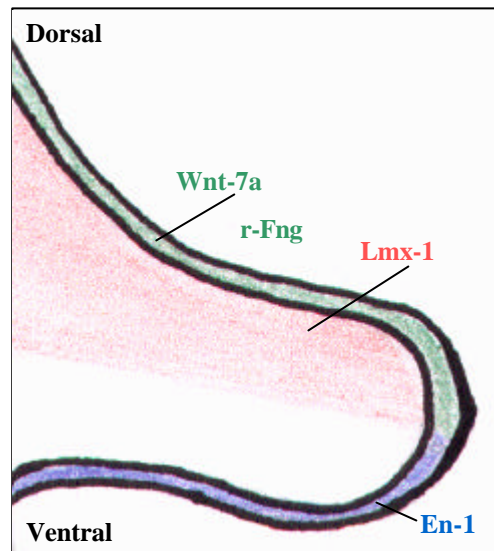


Abb. 4: Genexpression entlang der dorso-ventralen Achse einer Gliedmaßenknospe. Im dorsalen Ektoderm (grün) werden Wnt-7 und r-Fng als sekretierte Faktoren exprimiert, während Engrailed-1 (En-1) das ventrale Ektoderm durch seine Expression determiniert. Wnt-7 induziert die Expression von Lmx-1 im dorsalen Mesenchym und wird gleichzeitig durch En-1 im ventralen Ektoderm unterdrückt. Auf diese Weise restringieren Wnt-7 und En-1 zusammen die Lmx-1 positive Domäne (nach Johnson *et al.*, 1997)

1.2.2 Die Determination der proximo-distalen (P/D) Achse bei der Gliedmaßenentwicklung

Das an der Gliedmaßenentstehung beteiligte mesenchymale Gewebe spielt auch beim weiteren Auswachsen der Gliedmaßenknospe eine entscheidende Rolle. Das intermediäre und das laterale Mesoderm exprimieren im Bereich des zukünftigen Ausknospungsgebietes den Fibroblastenwachstumsfaktor 10 (fibroblast growth factor 10, Fgf10; Abbildung 2). Er ist in der Lage, im darüber liegenden, undifferenzierten Ektoderm die Expression von Fgf8 (fibroblast growth factor 8) vor Bildung der AER zu induzieren. Gleichzeitig ist dieser Faktor in der Lage, die Expression von Sonic hedgehog (Shh), welches das Signalmolekül der ZPA (polarisierende Zone) darstellt, im Mesoderm zu induzieren (Abbildung 3a und 3b). Das Zusammenspiel dieser ersten Signale mit den dazugehörigen Rezeptoren und auch die erste Expression früher *Hoxa*- und *Hoxd*-Gene (hoch konservierte Gene, die in allen Tierspezies gefunden werden und Mediatoren von Signalkaskaden kodieren) tragen dazu bei, daß sich die beiden Hauptsignalzentren der Gliedmaßenentwicklung, die AER und die ZPA, entwickeln können. Beide zusammen liefern die Grundlage für die Entstehung der Proliferationszone. Die von der AER

exprimierten, verschiedenen Fibroblastenwachstumsfaktoren (Fgf2, Fgf4 und Fgf8) stimulieren das darunter liegende Mesenchym zur Proliferation im undifferenzierten Zustand. Mit der Beobachtung dieser Zone ist das sogenannte Progreßzonen-Model des proximo-distalen Auswachsens der Gliedmaßen entstanden. Zellen, die diese Struktur schon im frühen Entwicklungsstadium verlassen, tragen zu proximalen Strukturen bei, während die dort länger verbleibenden Zellen eher distale Positionen einnehmen (Summerbell *et al.*, 1973a; 1973b).

1.2.3 Die Determination der antero-posterioren (A/P) Achse bei der Gliedmaßenentwicklung

Das entscheidende Signalzentrum für die A/P-Raumachse in der sich entwickelnden Gliedmaßenknospe ist die Polarisierungszone (ZPA), die sich am postero-distalen Rand der Gliedmaßenknospe befindet (Abbildung 3b). Zu ihrer Etablierung kommt es bereits vor dem sichtbaren Auswachsen. Sie wird ebenfalls wesentlich durch das Mesenchym und zwar das seitliche Mesenchym bestimmt. Durch tierexperimentelle Studien konnte gezeigt werden, daß Retinole offensichtlich eine Schlüsselrolle bei der Etablierung der initialen asymmetrischen Anordnung der anterioren und posterioren Region spielen. Diese induzieren ihrerseits die Expression des *Hoxb8*-Genproduktes im lateralen Mesoderm, dessen Domäne mit dem A/P (anterioren / posterioren)-Zellgebiet übereinstimmt, aus dem sich die ZPA bilden kann. Neben diesem Gen der *Hox*-Familie gibt es noch weitere Familienmitglieder wie z.B. die *Hoxd9-Hoxd13* und auch das *Hoxb-5*, die im Territorium des lateralen Mesoderms exprimiert werden und damit einen Einfluß auf die frühe Gliedmaßenentwicklung haben (Rancourt *et al.*, 1995; Cohn *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997). Obwohl die *Hoxb8*-Wirkung offensichtlich in der Lage ist, die ZPA an ihren exakten Ort zu positionieren, reicht sie nicht aus, um das Schlüssel-Signalmolekül Sonic hedgehog (Shh) als zentrales Molekül dieser Zone zu induzieren. Statt dessen scheint der Einfluß der Fgf-Genprodukte aus der AER sowohl für die Induktion, als auch die Aufrechterhaltung der *Shh*-Genexpression im posterioren Mesenchym eine entscheidende Rolle zu spielen. Das sezernierte Morphogen Shh hat seinerseits eine stimulierende Wirkung auf die AER, wodurch eine positive Interaktion in beide Richtungen entsteht, die man auch als positiven „feedback“ bezeichnet. Neben diesen Wechselwirkungen kommt es auch zu einem Zusammenspiel der Signalmoleküle in anderen Bereichen, wodurch weitere Zielgene von Shh im Mesoderm induziert werden, wie z.B.

die *Hoxd*-Gene und das *Bone morphogenic protein 2* (*Bmp-2*). Ausschlaggebend für all diese Abläufe ist allerdings, daß die gesendeten Signale auch den Ort ihrer Wirkung erreichen. Dazu werden Rezeptoren auf den entsprechenden Zielzellen benötigt, die das ankommende Signal aufnehmen und umwandeln können. Die spezifische Interaktion von Rezeptor und Ligand setzt innerhalb der Zelle eine Signalkaskade in Gang, die zu einer für das Signal exklusiven Reaktion führt. Im Fall von Sonic hedgehog wird das Protein von seinem Rezeptor Patched (Ptch) gebunden und das Signal dann über verschiedene Zwischenschritte an den Zellkern vermittelt. Dort interagiert ein Transkriptionsfaktor mit seiner speziellen DNA-Erkennungssequenz und erzeugt so eine für das Signalmolekül spezifische Antwort der Zelle (Ingham, 1998a; Kalderon, 2000). Dabei handelt es sich für das Vertebratensystem um die GLI-Proteine und für den Modellorganismus *Drosophila* um den Faktor cubitus interruptus (ci). Die verschiedenen Signalmoleküle gemeinsam sind über diese Signalkaskaden in der Lage, einen komplexen Prozeß wie die Gliedmaßenentwicklung zu regulieren.

Da sich diese Arbeit im besonderen mit den GLI-Proteinen, den Transkriptionsfaktoren der Vertebraten- bzw. humanen Hedgehog-Signalkaskade beschäftigt, soll dieser Signalweg und damit die Festlegung der antero-posteriore Achse der Gliedmaßenentwicklung in das Zentrum des Interesses gerückt werden. Vergleiche mit Homologen anderer Spezies, sowie die Detektion und Interpretation von Fehlbildungen kann helfen, einen Teilbereich dieser komplexen Regulationsprozesse besser zu verstehen.

1.3 Die hedgehog (hh)-Signalkaskade und die Rolle der beteiligten Faktoren

Viele der grundsätzlichen Regulationsmechanismen in der Embryonalentwicklung sind während der Evolution hoch konserviert. Die Natur greift dabei offensichtlich immer wieder auf bewährte Abläufe zurück, um sie als variierten Mechanismus für einen völlig neuen Organismus zu nutzen (Zeller, 1999). Der Ablauf und die Funktion dieser Signalwege sind im wesentlichen über Studien von Modellorganismen (z.B. Maus, Hühnchen und *Drosophila*) aufgedeckt worden. Die Untersuchungen zu *Drosophila* haben bislang das umfassendste Bild der antero-posterioren Signalweiterleitung geliefert und sollen hier exemplarisch vorgestellt werden.

Grundsätzlich ist der Weg in der das hedgehog (hh)-Signal aussendenden Zellen, von demjenigen in der hedgehog-Signal empfangenden Zellen zu unterscheiden. Die Ex-

pression des Proteins geht mit einer posttranslationalen Modifikation einher, bei der das C-terminale Ende von hedgehog autokatalytisch abgespalten wird. Das entstehende N-terminale Spaltprodukt wird am Carboxyterminus kovalent mit Cholesterin assoziiert und stellt die aktive Form von hedgehog dar (Lee *et al.*, 1994; Porter *et al.*, 1996; Ingham, 1998a; McMahon, 2000; Lewis *et al.*, 2001). Seine aminoternale Modifikation durch Kopplung der ebenfalls lipophilen Palmitinsäure ist bisher nur für das Vertebratenhomolog Sonic hedgehog (Shh) gezeigt, aber die hohe Konservierung der Modifikationsstelle spricht für einen generellen Prozeß. Diese Veränderung des Ausgangsproteins stellt die Grundlage für die geregelte Signalwirkung dar, denn sie erzeugt zum einen über den lipophilen Charakter eine Assoziation mit der Zellmembran der signalproduzierenden Zelle und zum anderen, wahrscheinlich über den dispatched (disp)-Rezeptor, eine gezielte Freisetzung des Moleküls (Pepinsky *et al.*, 1998; Chuang *et al.*, 2000). Dieser Rezeptor gehört zu einer Proteinfamilie mit zwölf Transmembran- und einer sterol-empfindlichen Domäne, die entscheidend für die Interaktion mit Cholesterin-assoziierten Proteinen ist. Neben der Beteiligung an der Freisetzung des modifizierten hh-Moleküls geht man bei dispatched ebenfalls von einem Einfluß auf den intrazellulären Transport und das Einschleusen des hh-Proteins in lipidreiche Zelldomänen aus (Burke *et al.*, 1999; McMahon *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2001). Diese Modifikationen und damit auch die Lokalisation des Proteins sind im Hinblick auf seine Funktion als Morphogen von besonderer Bedeutung. Es wirkt entlang eines Konzentrationsgradienten, der nur über eine streng regulierte Expression und Freisetzung von hh erzeugt werden kann. Ein solches Signalmolekül erzielt sowohl in nächster Umgebung, als auch über eine größere Entfernung, das heißt über mehrere Zellen hinweg seine Wirkung.

Nach der Freisetzung des hedgehog-Signals im posterioren Bereich der sich entwickelnden Gliedmaßenknospe, muß es in den anterioren Teilbereich gelangen, wo sich die Zielzellen befinden, die das Signal aufnehmen und in das Zellinnere weiterleiten können. Diese Signalaufnahme wird über einen Rezeptorkomplex vermittelt, der sich aus den Proteinen patched (ptc) und smoothed (smo) zusammensetzt. Bei patched handelt es sich, ebenfalls wie bei dispatched, um einen sterol-sensitiven Rezeptor mit zwölf Transmembran-Domänen. Er stellt den direkten Interaktionspartner für hh dar. Smo hingegen gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Sekretine und besitzt sieben Transmembran-Domänen. Smo interagiert nicht mit dem Signalmolekül direkt, sondern zeigt eine Assoziation zu patched, die nach neuer Datenlage nicht direkt ist (Alcedo *et al.*, 2000; Deneff *et al.*, 2000; Calderon, 2000). Es repräsentiert offensichtlich

den Faktor, der das Signal ins Zellinnere weiterleitet (Margio *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1996; Ingham, 1998a; Ingham, 2001). Das exakte Zusammenwirken der Rezeptorkomponenten ist noch nicht bekannt, aber *smo* scheint konstitutiv aktiv zu sein und wird in Abwesenheit eines hh-Signals durch *ptc* in seiner Wirkung gehemmt, indem es destabilisiert wird. Die Signalwirkung von hedgehog führt zu einer Internalisierung von *patched* und gleichzeitig zur Phosphorylierung und Stabilisierung von *smoothed*, wodurch seine konstitutive Aktivität die intrazelluläre Signalweiterleitung auslöst (Chuang *et al.*, 2000; Deneff *et al.*, 2000; Incardona *et al.*, 2000; Kalderon, 2000; McMahon, 2000; Karpen *et al.*, 2001). An dieser Signalkaskade, an der bisher acht bekannte, verschiedene Faktoren und Mikrotubuli beteiligt sind, ist sehr umfassend und noch nicht endgültig geklärt. Der erste Schritt ist die Wirkung von *smoothed* auf die Serin/Threonin Kinase *fused* (*fu*). Letztere ist Teil eines großen zytoplasmatischen Komplexes, in Assoziation mit Mikrotubuli, der zusätzlich die Proteine *suppressor of fused* (*su(fu)*), *costal-2* (*cos-2*) und *cubitus interruptus* (*ci*) enthält (Ingham, 1998a). Neben diesen komplexgebundenen Proteinen, sind an der Signalkette auch noch zusätzlichen Komponenten wie die Proteinkinase A (*Pka*), *slimb* (*slmb*), CREB bindendes Protein (*CBP*) und *tout-velu* (*ttv*) beteiligt (Perrimon, 1995; Altaba, 1997; Aza-Blanc *et al.*, 1999). Der *suppressor of fused* stellt einen Antagonisten zur Kinase *fu* dar. Er zeigt eine direkte Interaktion mit *costal-2* und enthält eine sogenannte PEST-Sequenz, Regionen der Aminosäurekette reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T), die mit Proteinen assoziiert wird, die einer schneller Degradation zugeführt werden sollen (Rogers *et al.*, 1986; Rechsteiner *et al.*, 1996; Monnier *et al.*, 1998). *Costal-2* hingegen ist ein den Kinesin-Motorproteinen verwandter Faktor, der eine hochaffine Mikrotubulibindung zeigt, die durch den Phosphorylierungsstatus des Proteins beeinflussbar ist (Robbins *et al.*, 1997; Sisson *et al.*, 1997). Der vierte komplexgebundene Faktor, *cubitus interruptus* (*ci*), ist ein Transkriptionsfaktor mit einer Zinkfingerdomäne (ZFD) als DNA-bindendes Motiv. Er ist das einzige DNA-bindende Protein dieser Signalkaskade mit einer ungewöhnlichen, *cos-2* vermittelten Assoziation zu den Mikrotubuli im Zytoplasma. Dies bedeutet, eine Signalübertragung in den Kern ist nur möglich, wenn diese Verbindung gelöst wird und es zu einer Lokalisationsänderung kommt (Alexandre *et al.*, 1996; Aza-Blanc *et al.*, 1997; Ohlmeyer *et al.*, 1998; Aza-Blanc *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Die cAMP abhängige Serin/Threonin Proteinkinase A hat einen essentiellen regulatorischen Einfluß auf die Signalwirkung, da innerhalb dieser Kaskade die Aktivität einiger Proteine, unter anderem *fu*, *cos-2* und *ci*, über den Phosphorylierungssta-

tus bestimmt wird (Jiang *et al.*, 1995; Lepage, *et al.*, 1995; Perrimon, 1995; Chen *et al.*, 1998). Slimb gehört zu den F-Box-Proteinen und ist homolog zum cdc 4-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*. Sie haben eine Bedeutung bei der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse durch das Proteasom. Die Wirkung von slimb wird im Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor cubitus interruptus gesehen (Feldmann *et al.*, 1997; Skowrya *et al.*, 1997; Ingham 1998a; Jiang *et al.*, 1998; Aza-Blanc *et al.*, 1999). Ein weiteres Protein, daß mit ci direkt interagiert, ist CBP (CREB bindendes Protein). Es gilt als genereller Ko-Aktivator und Repressor vieler Transkriptionsfaktoren und nimmt dadurch Einfluß auf viele Prozesse in der Embryogenese. Darüber hinaus kann sich sein regulatorischer Einfluß aber auch auf die subzelluläre Verteilung von Proteinen auswirken (Kwok *et al.*, 1994; Gilles *et al.*, 1998). Tout-velu als Azetylglykosaminyltransferase ist ein Enzym, das an der Synthese bestimmter Glykosaminglykane beteiligt ist. Eine definierte Form dieser Heparinsulfat-modifizierten Zelloberflächenmoleküle zeigt eine direkte Interaktion mit dem hedgehog-Protein. Das Zusammenwirken beider Proteine kann entweder zur Endozytose von hh dienen, oder aber es unterstützt die Weiterleitung des posterioren hh-Signals innerhalb des anterioren Bereiches an die umliegenden Zellen (Ingham, 1998b; McMahon, 2000; Zeng, 2001).

1.3.1 Abwesenheit des hedgehog-Signals im anterioren Bereich

Senden die Zellen des posterioren Bereiches einer Flügelanlage bei *Drosophila* kein polarisierendes Signal aus, so kann im anterioren Bereich die hedgehog-abhängige Signalkaskade nicht aktiviert werden (Abbildung 5). Das bedeutet allerdings nicht, daß zwischen den beteiligten Molekülen keine spezifischen Interaktionen stattfinden, denn innerhalb dieser Signalweiterleitung unterscheidet man zwei unterschiedlichen Aktivitätszustände. Die Anwesenheit sowie die Abwesenheit des hedgehog-Proteins haben einen regulatorischen Einfluß auf die Zellen. Der Rezeptorkomplex aus patched und smoothed hat ohne ein spezifisches Signal keine Wirkung auf die Kinase fu, denn die inhibitorische Wirkung von ptc auf das konstitutiv aktive smo bleibt erhalten. Fu kann bei fehlender Aktivierung der inhibitorischen Wirkung von su(fu) und auch von cos-2 nicht entgehen. Der im Zytoplasma vorhandene Multiproteinkomplex aus fused, costal-2, suppressor of fused und cubitus interruptus bleibt aus diesem Grund an die Mikrotubuli assoziiert. cos-2 stellt dabei das Brückenmolekül zwischen den Mikrotubuli, Fu und Ci dar, während sich die direkte Interaktion von su(fu) nur auf fu und ci bezieht (Mon-

nier *et al.*, 1998; Aza-Blanc *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000a). Die nicht zu lösende Interaktion mit dem Zytoskelett und der damit verbundene Rückhalt der assoziierten Proteine im Zytoplasma, ermöglicht der Proteinkinase A, den Transkriptionsfaktor ci (ci^{155} , Gesamtprotein) zu phosphorylieren (Chen *et al.*, 1999). Diese phosphorylierte Form bleibt nur kurzfristig erhalten, denn sie ist offensichtlich das Zielmolekül von Proteasomen. Es kommt zu einer slimb-vermittelten Spaltung von ci^{155} in eine C-terminal verkürzte, ca. 75 kDa schwere Form, ci^{75} . Diese, aus dem N-Terminus von Cubitus interruptus bestehende Form, wird in großen Mengen gebildet und aus dem zytoplasmatischen Komplex freigesetzt. ci^{75} enthält neben seiner DNA-bindenden Domäne auch noch das Kernlokalisierungssignal (NLS), wodurch es zu einer subzellulären Umverteilung in den Kern kommt. Dort ist das verkürzte Protein quantitativ nachweisbar (Aza-Blanc *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Es wird als die cubitus interruptus-Repressorform (ci^{Rep}) bezeichnet, denn eine C-terminal gelegene Transkriptionsaktivierungsdomäne, gebildet von einer Region mit sauren Aminosäuren und einer Interaktionsdomäne für den Ko-Aktivator CBP sind in dieser N-terminalen Form nicht mehr vorhanden (Alexandre *et al.*, 1996; Akimaru *et al.*, 1997). Auf diese Weise wird die Transkription einiger Zielgene des hedgehog-Signals nicht nur nicht angeschaltet, sondern sie wird aktiv verhindert. Diese repressorische Wirkung, die sich zum einen auf *hedgehog* selber und zum anderen auf *decapentaplegic* (*dpp*), ein Protein aus der TGF- β -Familie (transforming growth factor- β), bezieht, ist ein Hinweis auf die strikte Regulation dieser Signalkaskade.

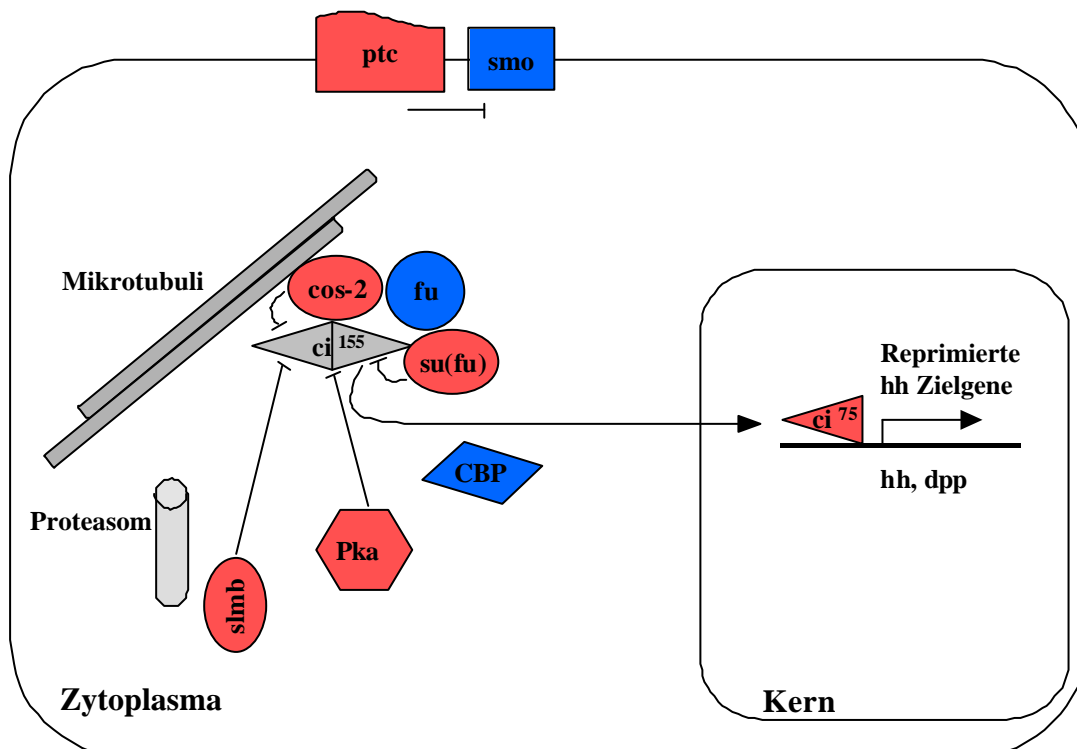


Abb. 5: Schematische Darstellung der zellulären Vorgänge in Abwesenheit des hedgehog-Signals. Das konstitutiv aktive *smoothed* (*smo*) wird in dieser Situation von *patched* (*ptc*) gehemmt und kann nicht auf die Kinase *fused* (*fu*) wirken. Der zytoplasmatische Multiproteinkomplex aus dem Kinesin-ähnlichen *cos-2*, aus *fu*, aus dem *suppressor of fused* (*su(fu)*) und aus dem Transkriptionsfaktor *cubitus interruptus* (*ci*) behält dadurch seine Assoziation mit den Mikrotubuli. Durch das fehlende *hh*-Signal können alle negativen Regulatoren der Signalkaskade ihre Wirkung auf *ci* ausüben. Seine daraus resultierende Phosphorylierung macht ihn für die durch *slmb* (*slmb*)-vermittelte Proteolyse durch das Proteasom zugänglich. Die so entstehende, C-terminal deletierte Repressorform von *cubitus interruptus*, kann sich aus dem Komplex lösen und ändert seine subzelluläre Lokalisation Richtung Kern. Die im N-Terminus noch vorhandene Zinkfinger-Domäne ermöglicht die spezifische Interaktion mit der DNA-Erkennungssequenz, aber durch die fehlende Transaktivierungs- und CBP-bindende Domäne kommt es zu einer Repression der *ci*-Zielgene. Alle Komponenten mit negativer Wirkung auf die Ci-Aktivität sind rot dargestellt. Positive Regulatoren der Signalkaskade wurden durch Blaufärbung markiert.

1.3.2 Anwesenheit des hedgehog-Signals im anterioren Bereich

Kommt es zur Freisetzung eines durch Cholesterin und Palmitinsäure lipophil modifizierten hedgehog-Moleküls, so muß es vom Ort seiner Entstehung, dem posterioren Kompartiment der Flügelanlage bei *Drosophila*, zum Ort seiner Wirkung, dem anterioren Kompartiment, gelangen (Abbildung 6). Dabei muß es den Weg über einige Zellreihen hinweg zurücklegen, wobei die lipophilen Modifikationen ein Problem darstellen, wenn man von einer durch einen Konzentrationsgradienten gerichteten Diffusion ausgeht. Drei mögliche Lösungen dieser Problematik, die sowohl für das *Drosophila* hedgehog-Protein, als auch für die Orthologen bei den Vertebraten vorstellbar sind, sind durch neue experimentelle Daten aufgezeigt worden (Chuang *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2001; Telemann *et al.*, 2001). Zum einen kann die Weiterleitung des Signals durch einen direkten intrazellulären Transport über Zytoplasmaausläufer, auch Zytonemata genannt, erfolgen (Morata *et al.*, 1999; Ramírez-Weber *et al.*, 1999; Vogel, 1999). Dabei handelt es um einen Mechanismus, der bei der Signalweiterleitung von Axonen auf Gliagewebe innerhalb der Entwicklung des Nervensystem für Vertebraten gezeigt werden konnte (Wallace *et al.*, 1999). Zum anderen soll eine über wiederholte Endozytose und Resekretion benachbarter Zellen vermittelte Weiterleitung des Morphogens stattfinden (Moline *et al.*, 1999; Entchev *et al.*, 2000). Als drittes konnte eine neue, frei diffundierende, Cholesterin-modifizierte hedgehog-Form detektiert werden, die ein Multimer bildet, welches biologisch aktiv ist. Der dispatched-Rezeptor der *hh*-sendenden Zelle ist entweder an der Bildung dieser multimeren Struktur beteiligt, oder aber dirigiert die

Einzelkomponenten in lipidreiche Domänen der Zelle, wo sie gepackt werden. Bei der Multimerisierung wird der lipophile Anteil der einzelnen hedgehog-Proteine im Inneren der Struktur verborgen, so daß der Komplex frei diffundierbar wird, ein Vorgang, der durch Transfektionsexperimente mit dem Vertebratenhomolog von hedgehog, Sonic hedgehog, beobachtet werden konnte (Zeng *et al.*, 2001). Sobald das hh-Signal auf dem einen oder anderen Weg sein Zielgebiet erreicht hat, kann es seine Funktion wahrnehmen. Die Zellen des anterioren Bereichs der sich entwickelnden Flügelanlage besitzen dafür den nötigen Rezeptorkomplex aus patched (ptc) und smoothed (smo), wobei ersterer mit hedgehog direkt interagiert. Grundsätzlich befinden sich auf der Zelloberfläche nur wenige ptc-Moleküle. Erst die Bindung des spezifischen Signals sorgt zum einen für die Freisetzung dieser Moleküle aus zellulären Vesikeln und zum anderen für eine zusätzliche Induktion der Rezeptorbildung. Hat diese Bindung stattgefunden, so hebt hh die inhibitorische Wirkung von ptc auf smo auf und bewirkt damit eine Oberflächenakkumulation vom smo-Protein. Diese Anreicherung des Rezeptormoleküls führt zur intrazellulären Signalweiterleitung (Alcedo *et al.*, 2000; Deneff *et al.*, 2000; Kalderon, 2000). Gleichzeitig wird aber das auf der Oberfläche befindliche hh-Protein durch ptc-rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und aggregiert in Vesikeln, die später der lysosomalen Degradation zugeführt werden (Parton *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1999; Karpen *et al.*, 2001). An dieser Vesikelbildung ist offensichtlich auch ein Bereich der transmembranen Domäne von ptc, die sterolsensitive Domäne, beteiligt. Ihre Ähnlichkeit mit der Domäne des Niemann-Pick C1-Proteins legt die Vermutung nahe, daß auch ptc in den endozytotischen Vesikeln an der Wiederverteilung von hedgehog-assoziiertem Cholesterin und lipophilen Substanzen beteiligt ist (Incardona *et al.*, 2000; Takabatake *et al.*, 2000). Die Hochregulation und Oberflächenaggregation von ptc mit der nachfolgenden Endozytose des gebundenen Signalmoleküls, stellt einen Regulationsmechanismus für das hh-Signal dar, denn auf diese Weise wird sein Aktionsradius konzentriert und limitiert auf die vorderen Bereiche des anterioren Kompartiments (Chen *et al.*, 1996; Ingham, 1998a). Bei der intrazellulären Signalweiterleitung über smo, dessen biochemischen Fähigkeiten nahezu unbekannt sind, kommt es zu einer hh-vermittelten Phosphorylierung der Proteinkinase fused und dem Kinesin-ähnlichen Molekül costal-2. Diese ersten Schritte in der Signalkaskade bewirken, daß sich der große zytoplasmatische Komplex aus fu, su(fu), cos-2 und ci von den Mikrotubuli löst, fu Kinase aktiviert wird und ci als Protein mit voller Länge aus diesem Komplex freigesetzt wird. Auf diese Weise entkommt es dem reprimierenden Einfluß von cos-2 und su(fu)

und der zytoplasmatischen Retention. Diese Umstrukturierungsprozesse bedeuten, daß die durch Proteinkinase A und slimb-vermittelte Proteolyse von cubitus interruptus durch Proteasomen nicht stattfindet. Vielmehr befindet es sich als Gesamtprotein im Zytoplasma (ci^{155}), wo es auch nachweisbar ist (Thérond *et al.*, 1996; Aza-Blanc *et al.*, 1997; Kalderon, 1997; Ingham, 1998a; Wang *et al.*, 1999). Obwohl ci^{155} alle für seine Wirkung nötigen Domänen besitzt, ist seine Wirkung als Transkriptionsaktivator bisher nicht gezeigt worden. Eine erneute Modifikation, vermittelt durch die nun aktive *fu* Kinase, wandelt das *ci*-Gesamtprotein in einen Aktivator um (ci^{Akt}). Diese Umwandlung, die durch den suppressor of fused reprimiert werden kann, erzeugt entweder eine äußerst labile *ci*-Form, oder aber der Proteinlevel liegt unterhalb einer Nachweisgrenze (Monnier *et al.*, 1998; Ohlmeyer *et al.*, 1998; Aza-Blanc *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999). Der durch die Umwandlung entstandene ci^{Akt} kann mit dem gebundenen Kofaktor CBP im Zellkern als transkriptioneller Aktivator die Expression der hedgehog-Zielgene induzieren. Zu den Zielgenen, die über cubitus interruptus von *hh* positiv reguliert werden, gehören der Rezeptor dieser Kaskade *patched* (*ptc*), das Morphogen des A/P-Organisationszentrums *decapentaplegic* (*dpp*) an der Grenze zwischen diesen beiden Domänen, *wingless* (*wg*) im ventralen embryonalen Ektoderm als Morphogen einer weiteren Signalkaskade und *engrailed* (*en*), das einer bestimmten Zellgruppe die posteriore Determination verleiht und dessen Expression durch die *wg*-Signalkette aufrecht erhalten wird. In der Abbildung 6 findet sich eine schematische Zusammenfassung der hedgehog-Signalkaskade in Anwesenheit des polarisierenden Signals.

Die genaue Betrachtung der hedgehog-Signalkette macht deutlich, daß cubitus interruptus das zentrale Molekül dieser Kaskade ist, denn es erhält unterschiedliche Funktionen, die durch Modifikationen am Protein erzielt werden. Alle anderen Komponenten, die Teil dieser Signalweiterleitung sind, haben lediglich eine regulatorische Wirkung, in deren Mittelpunkt jeweils *ci* steht. Eine interessante Frage in diesem Zusammenhang ist, ob diese zentrale Rolle dieses Transkriptionsfaktors während der Evolution im Vertebratensystem und auch bei der humanen Embryogenese konserviert ist.

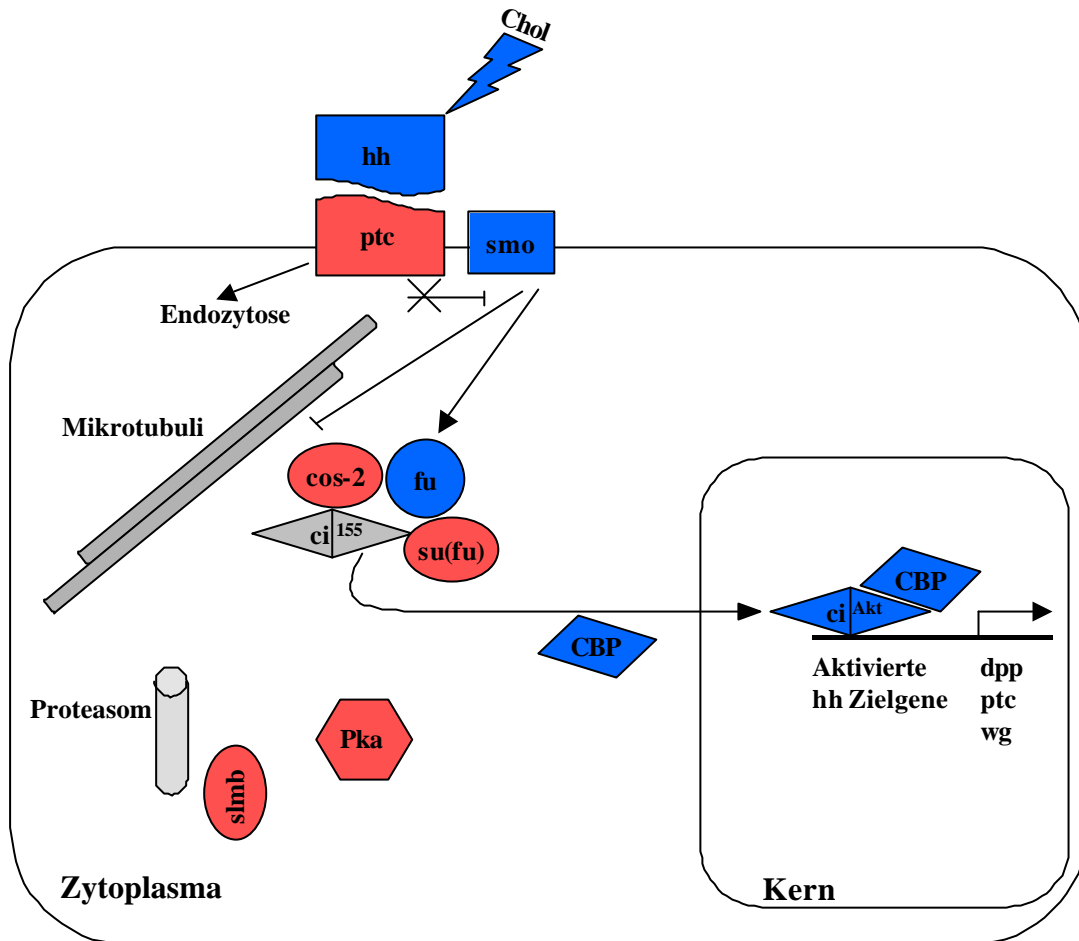


Abb. 6: Schematische Darstellung der Auswirkungen eines eintreffenden hedgehog-Signals auf zellulärer Ebene. Im posterioren Kompartiment exprimiertes, modifiziertes und sezerniertes hh-Protein bindet an den ptc-smo-Rezeptorkomplex der Zellen im anterioren Bereich. Durch hh-vermittelte Endozytose von ptc und Phosphorylierung von smo, wird die inhibitorische Wirkung von ptc aufgehoben und es kommt zu einer Stabilisierung des smo-Signals. Seine Interaktion mit der Kinase fused resultiert in einer Inhibition des Kinesin-ähnlichen Proteins costal-2, welches das Brückenmolekül zwischen den Mikrotubuli und dem zytoplasmatischen Multiproteinkomplex, aus fu, suppressor of fu, cos-2 und dem Transkriptionsfaktor cubitus interruptus, darstellt. Diese Inhibition von cos-2 und gleichzeitig auch von su(fu) bewirkt die Auflösung der Interaktion zwischen dem Komplex und den Zytoskelettstrukturen und eine Freisetzung des Transkriptionsfaktors. Das ci-Protein (ci^{155}) wird damit zugänglich für eine durch fused-vermittelte Umwandlung in eine labile Aktivatorform (ci^{Akt}) des Gesamtproteins. Zusammen mit dem Koaktivator CBP führt ci^{Akt} über die spezifischen Bindung an die DNA-Erkennungssequenz zur Aktivierung der Zielgene führt. Alle Komponenten mit negativer Wirkung auf die ci-Aktivität, sind rot dargestellt, die positive Regulatoren der Signalkaskade sind durch Blaufärbung markiert.

1.4 Das Hedgehog-Signal im Vertebratensystem: Konservierung von Faktoren

Viele Erkenntnisse bezüglich komplexer Regelkreisläufe während der Entwicklung, die durch Studien im Invertebratensystem wie z.B. *Drosophila* gewonnen werden, sind hilfreich, um die Vertebratensysteme und auch die humane Embryogenese zu untersuchen. Dabei gilt es, Homologe bzw. Orthologe der einzelnen Interaktionspartner im entsprechenden System zu detektieren und zu prüfen, ob sie an der Etablierung der konservierten Signalketten beteiligt sind. Für die Hedgehog-Kaskade ist dies vor allem über Expressionsstudien und Manipulationen während der Embryonalentwicklung von Hühnchen und Maus realisiert worden (Cohn *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997; Platt *et al.*, 1997; Borycki *et al.*, 1998; Büscher *et al.*, 1998; Christen *et al.*, 1998; Sanz-Ezquerro *et al.*, 2000).

1.4.1 Mitglieder der *Drosophila* hedgehog-Kaskade werden bei Vertebraten durch Genfamilien repräsentiert

Eine häufige Beobachtung beim Vergleich von Faktoren und auch Signalkaskaden aus *Drosophila* mit denen des Vertebratensystems ist, daß diese zwar konserviert sind, aber die Wechselwirkungen an Komplexität zunehmen, weil einzelne Orthologe in ihrer Funktion durch Proteinfamilien ersetzt werden. So hat für das Signalmolekül hedgehog in höheren Vertebraten eine Zunahme auf drei Paraloge stattgefunden, die sowohl überlappend als auch in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. *Sonic hedgehog* (*Shh*) zeigt eine Expression im ventralen Neuralrohr und den angrenzenden Somiten. Es ist an der Festlegung der rechts-links Asymmetrie beteiligt, entwickelt eine polarisierende Wirkung bei der Gliedmaßenentwicklung und wirkt als Morphogen bei der Entwicklung des Auges, der Lunge, der Haare und verschiedener Organe des Verdauungstraktes (Kraus *et al.*, 1993; Riddle *et al.*, 1993; Fan *et al.*, 1995; Roelink *et al.*, 1995). *Indian hedgehog* (*Ihh*) dagegen koordiniert die Proliferation und Reifung der Chondrozyten während der Entwicklung des enchondralen Skeletts. Seine biologische Aktivität ist der von *Shh* ähnlich, denn es stimuliert teilweise gleiche Zielgene, wie *Hoxd11*, *Hoxd13* und *Bmp-2* (Bitgood *et al.*, 1995; Vortkamp *et al.*, 1996; St-Jacques *et al.*, 1999). *Desert hedgehog* (*Dhh*) hat seine Bedeutung bei der Regulation der Spermatogenese (Bitgood *et al.*, 1996).

Auch der Hedgehog-Rezeptor *Patched* (*Ptch*) zeigt eine Aufteilung in zwei Familienmitglieder bei *Xenopus*, Maus, Hühnchen und dem Menschen. Die *Patched-2* Expression beschränkt sich auf alle Hh-Signal empfangenden Zellen, während *Patched-1* eine breitere Verteilung zeigt, die zum größten Teil nicht mit *Ptc-2* überlappt. Beide lassen sich jedoch durch gleiche Signalmoleküle, z.B. Shh und Noggin, induzieren, was eine konservierte Regulation beim Aktivierungsmechanismus zeigt (Carpenter *et al.*, 1998; Smyth *et al.*, 1999; Takabatake *et al.*, 2000).

Der Transkriptionsfaktor der hedgehog-Kaskade *cubitus interruptus* gehört zu den Segmentpolaritätsgenen, einer Untergruppe aller Segmentierungsgene. Sie regulieren die Unterteilung des *Drosophila*-Embryos in 15 Segmente, aus denen dann die verschiedenen Körperteile entstehen. Seine Aktivierung führt zu einer Hochregulation der hh-Zielgene *wingless*, *decapentaplegic* und *patched*, die einen Einfluß auf die Morphogenese der posterioren Anteile eines jeden Segmentes haben (Slusarski *et al.*, 1995; Forbes *et al.*, 1996; Aza-Blanc *et al.*, 1997 Ohlmeyer *et al.*, 1999). Die DNA-Bindung dieses Faktors findet dabei über eine Zinkfingerdomäne mit fünf Zinkfingern statt (Orenic *et al.*, 1990; Alexandre *et al.*, 1996; Von Ohlen *et al.*, 1997). Dieses DNA-Bindungsmotiv findet sich hochkonserviert bei *C. elegans* in den *tra*-Proteinen (Zarkower *et al.*, 1992; 1993) und bei den Vertebraten innerhalb der Gli-Genprodukte (Humane *GLI*-Familie: Kinzler *et al.*, 1988; Ruppert *et al.*, 1988; Murine *Gli*-Familie: Ruppert *et al.*, 1988; Hui *et al.*, 1994; *Gli*-Familie im Hühnchen: Marigo *et al.*, 1996; *Gli*-Familie bei *Xenopus*: Lee *et al.*, 1997; Marine *et al.*, 1997). Die *tra-1* bis *tra-3* Proteine in *C. elegans* sind an der Geschlechtsbestimmung im somatischen Gewebe beteiligt, wobei *tra-1* das endgeschaltete Kontrollgen darstellt. Neben dieser strukturellen Gemeinsamkeit scheint es auch im regulatorischen Bereich Übereinstimmungen zu geben, denn der 3' untranslatierte Bereich der *tra-2* Genregion enthält offensichtlich ähnliche Regulationselemente wie *Gli*, das Vertebratenhomolog von α und *tra* (Jan *et al.*, 1997). *Gli* bildet ebenfalls eine Genfamilie, die sowohl bei Mensch, Maus, Hühnchen und *Xenopus* jeweils aus drei Familienmitgliedern besteht. Der ähnlich hohe Grad an Konservierung ihrer Zinkfingerdomänen untereinander wie auch mit *ci* ließ vermuten, daß sie wohl gleichfalls eine Rolle bei dem zum hedgehog-homologen Signalweg in Vertebraten, der Sonic hedgehog-Signalkaskade, spielen (Humane *GLI*-Familie: Stone *et al.*, 1998; Tanimura *et al.* 1998; Villavicencio *et al.*, 2000; Murine *Gli*-Familie: Hui *et al.*, 1994; Thien *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 1997; *Gli*-Familie im Hühnchen: Borycki *et al.*, 1997; *Gli*-Familie bei *Xenopus*: Lee *et al.*, 1997; Marine *et al.*, 1997).. Neben der hohen

Übereinstimmung im Bereich der DNA-Bindungsstelle, die auf der Aminosäureebene teilweise ungefähr 90% beträgt, gibt es aber noch sechs weitere Sequenzbereiche, die sich ebenfalls durch eine hohe Konservierung auszeichnen. Diese Genregionen sind nicht nur innerhalb der Familie einer Spezies, sondern auch in den Orthologen zu beobachten. Bemerkenswert dabei ist, daß orthologe Gene eine höhere Übereinstimmung zeigen, wie die Paralogen einer Familie, denn das *GLII* Gen des Menschen ist dem der Maus ähnlicher, als seinen Familienmitgliedern *GLI2* und *GLI3*. Die unveränderte Erhaltung dieser Domänen und die Beteiligung am gleichen Signalweg legen die Vermutung nahe, daß diese Sequenzen für definierte Funktionen kodieren, die ebenfalls über die Speziesgrenzen hinweg konserviert sind.

1.4.2 Die *GLI*-Genfamilie beim Menschen

Diese Familie besitzt drei Mitglieder, wobei *GLII* (früher: *GLI*) ursprünglich als nukleäres Oncogen durch Überexpression in malignen Glioma und Sarkoma entdeckt wurde (Ruppert *et al.*, 1988). Durch seine hochkonservierte Zinkfingerdomäne mit fünf tandem-orientierten DNA-bindenden Zinkfingermotiven vom C₂H₂-Typ, gilt es als Prototyp der *GLI-krüppellike*-Genfamilie. All diesen Faktoren ist die Funktion als Transkriptionsfaktor gemeinsam, der ein 9 bp DNA-Konsensusmotiv erkennt und bindet: GAC-CACCCA (Kinzler *et al.*, 1990). Das humane *GLII* liegt auf Chromosom 12q13.3, überspannt eine genomische Region von 13 kb, enthält 12 Exons, besteht aus 3648 Basenpaaren und wird in ein 1106 Aminosäure langes Protein translatiert. Seine Transkriptionsregulation findet ähnlich wie bei *ci* über einen TATA-losen Promotor statt, der von einer GC-reichen Region und einer CpG-Insel überlagert wird (Schwarz *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998). Das humane Protein besitzt mit einer allgemeinen Aminosäureidentität von 85% eine hohe Homologie zum murinen Protein. Das humane *GLI2* hat seine chromosomale Lokalisation in 2q14, aber seine genomische Struktur und Sequenz sind noch nicht vollständig geklärt (Ruppert *et al.*, 1988; Stone *et al.*, 1998; Tanimura *et al.*, 1998). Für bereits analysierte Bereiche des humanen *GLI2* zeigt sich eine überaus hohe Homologie zum murinen Protein. Sowohl die DNA-bindenden Region, als auch die *GLI*-Homologiedomäne 1 zeigen auf Aminosäureebene eine 100%ige Identität der beiden Proteine (Hughes *et al.*, 1997). *GLI3* als humaner Transkriptionsfaktor von C₂H₂-Zinkfingertyp überspannt einen genomischen Bereich von 240 kb auf Chromosom 7p13. Die Organisation in 15 Exons mit einem 3 kb langen 3' untranslatierten Bereich

führt zu einer 8,5 kb langen mRNA mit einem 5055 bp offenen Leserahmen, welcher in ein Protein aus 1580 Aminosäuren übersetzt wird (Kinzler *et al.*, 1990; Ruppert *et al.*, 1990; Vortkamp *et al.*, 1995a; Wild *et al.*, 1997). Die Regulation der Genexpression geschieht unter anderem über einen 230 bp langen Bereich einer CpG-Inseln mit spezifischer Promotoraktivität, welcher unmittelbar vor dem bekannten 5' Ende der cDNA liegt. Der Translationstart liegt im zweiten Exon (Jacobsen, 1996). Das 190 kDa schwere GLI3 Protein zeigt, wie die anderen beiden Familienmitglieder, eine Bindung zu der konservierten 9 bp Konsensussequenz (Kinzler *et al.*, 1990). Bei einem direkten Vergleich der GLI-Proteine fällt auf, daß GLI3 und GLI2 untereinander sowohl strukturell als auch funktionell wesentlich näher verwandt sind, als diese zu GLI1. Sequenzvergleiche zwischen humanem GLI3 und murinem GLI2 zeigten, daß beide neben den bereits bekannten sieben Homologiedomänen noch fünf weitere Regionen besitzen, die in GLI1 nicht detektiert werden können. Eine befindet sich vor der eigentlichen Domäne 1 und die anderen hinter den GLI-Domänen 1, 4, 5 und 7. Auch im Vergleich zu weiteren Mitgliedern der *GLI*- und *Krüppel*-Genfamilie zeigen diese beiden Proteine mit 48% Aminosäureidentität bezogen auf die gesamte Proteinlänge die höchste Homologie (Hughes *et al.*, 1997). Neben der Interaktion mit CBP (CREB-bindendes Protein), die GLI3 mit GLI2 gemeinsam hat, zeigen beide Proteine ein zum Teil sehr ähnliches Expressionsmuster, so daß man neben ihrer spezifischen Rollen während der embryonalen Entwicklung, auch von redundanten Funktionen ausgehen kann. Erhärtet wurde die Vermutung für Redundanz noch durch die Doppel-GLI2/GLI3-*knock outs* (Mo *et al.*, 1996). Die Beobachtungen zum Expressionsmuster stammen hier, ähnlich wie für GLI1, von Beobachtungen im murinen System (Büscher *et al.*, 1998; Motoyama *et al.*, 1998; Schweitzer *et al.*, 2000; Brewster *et al.*, 2000)

1.4.3 Funktionelle Gemeinsamkeiten zwischen humanem *GLI3* und *cubitus interruptus*

Das aus 1377 Aminosäuren bestehende *Drosophila* Protein *cubitus interruptus* zeigt neben der DNA-bindenden noch zwei weitere Domänen mit bedeutender Similarität zum humanen GLI3. Die erste, N-terminal zur Zinkfingerregion gelegen, umfaßt die Aminosäurepositionen 192-272, während die C-terminale durch die Aminosäurereste 852-897 des *ci* Proteins repräsentiert wird. Bei GLI3 umfaßt dieser erste Bereich die Region 1 (Aminosäuren 279 und 348), während der zweite Homologieblock zwischen

Region 4 und 5 liegt (Aminosäure 872 und 913). Die entsprechenden Homologiebereiche auf Sequenzebene sind in Abbildung 7 in Form gleich gestalteter Boxen dargestellt (Kalff-Suske *et al.*, 1999).

Die fünf zusätzlichen Homologiedomänen, die sich aus der Konservierung innerhalb der *GLI*-Genfamilie ergeben, sind ebenfalls beim humanen Transkriptionsfaktor eingezeichnet (Ruppert *et al.*, 1990). Ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (NLS) befindet sich am C-terminalen Ende der DNA-Bindungsdomäne von *cubitus interruptus*, wobei der erste Teil sich innerhalb (aa 596-600) und der zweite Teil (aa 611-614) außerhalb dieser Domäne befindet. Die Sequenz, die einen gerichteten Transport in den Zellkern vermittelt, ist sowohl bei der Vertebraten *Gli*-Genfamilie als auch in *tra-1* von *C. elegans* zu identifizieren. Bei *GLI3* befinden sich beide Anteile dieser NLS vollständig innerhalb des Zinkfingerbereiches und werden durch die Aminosäuren 625-629 bzw. 640-643 repräsentiert (Wang *et al.*, 1999). Die proteolytische Spaltstelle (PC), die zur Generierung der C-terminal deletierten Repressorform von *ci* benötigt wird, liegt unmittelbar hinter dem NLS zwischen den Aminosäuren 650 und 700 (Aza-Blanc *et al.*, 1997). Bei nicht vorhandener Proteolyse befindet sich *cubitus interruptus* assoziiert am Zytoskelett in einem Multiproteinkomplex. Eine dafür nötige Interaktionsstelle (CT) liegt bei aa 703-835. Aber auch C-terminal dieses Sequenzbereiches müssen Domänen existieren, die eine zytoplasmatische Akkumulation des Proteins vermitteln (Wang *et al.*, 1999). Erste Daten bezüglich einer möglichen Spaltung von *GLI3* zeigten diese posttranslationale Modifikation im Bereich um aa 650-750 als eine Möglichkeit der Regulation des Proteins auf, eine zytoplasmatische Retention war bisher nicht nachweisbar (Dai *et al.*, 1999; Aza-Blanc *et al.*, 2000). Eine weitere Modulations- bzw. Regulationsmöglichkeit von Proteinen wird häufig über ihren Phosphorylierungsstatus vermittelt. Sowohl *cubitus interruptus* als auch *GLI3* enthalten Konsensusbereiche für eine Proteinkinase A-vermittelte Phosphorylierung (RRXS/T; Kemp *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 1999). Im C-terminalen Bereich beider Transkriptionsfaktoren kann je eine Domäne saurer Aminosäuren (*ci*: Aminosäureposition 1044-1060; *GLI3*: Aminosäureposition 1495-1512) ausgemacht werden, die eine α -helikale Struktur ausbilden (Orenic *et al.*, 1990; Ruppert *et al.*, 1990). Solche Strukturen haben nachweislich eine transaktivierende Wirkung, so daß diese Funktion für beide Proteine postuliert und gezeigt werden konnte (Yoon *et al.*, 1998; Kalff-Suske *et al.*, 1999). Innerhalb des humanen *GLI3*-Proteins befindet sich aber neben der transaktivierenden Domäne 1 (TA₁, die letzten 204 Aminosäuren des Proteins), die die amphipatische Helix enthält, noch

eine zweite, TA₂, die von den 278 Aminosäuren zwischen den Positionen 1044-1322 repräsentiert wird. Für diesen zweiten Bereich mit transaktivierender Wirkung konnte bisher kein konserviertes Strukturmotiv gezeigt werden (Kalff-Suske *et al.*, 1999). Zusätzlich zu diesen Sequenzabschnitten, die transkriptionell aktivierend wirken, findet man sowohl bei *cubitus interruptus* (zwischen den Aminosäuren 1020 und 1160), als auch bei GLI3 (an Aminosäureposition 827-1132) eine CBP-Interaktionsdomäne. Das CREB-bindende Protein ist multifunktionell, aber seine wesentliche Bedeutung im Zusammenwirken mit Transkriptionsfaktoren ist die eines Ko-Aktivators, der eine bereits vorhandene Aktivität von *ci* und GLI3 noch verstärkt (Akimaru *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 1999). Die bisher beschriebenen strukturellen und funktionellen Eigenschaften werden überwiegend vom C-Terminus der Proteine determiniert. Eine wesentliche Eigenschaft allerdings, die sowohl *ci* und möglicherweise GLI3 zu einem bifunktionellen Molekül werden läßt, ist die repressorische Wirkung. Erste Hinweise, daß diese N-terminal der Zinkfinger kodiert ist, zeigen sowohl experimentelle Daten mit *ci* (Alexandre *et al.*, 1996), als auch mit GLI3 (Dai *et al.*, 1999; Ruiz i Altaba, 1999; Sasaki *et al.*, 1999). Alle bekannten Homologiebereiche auf Sequenz- und funktioneller Ebene sind in der Abbildung 7 schematisch zusammengefaßt.

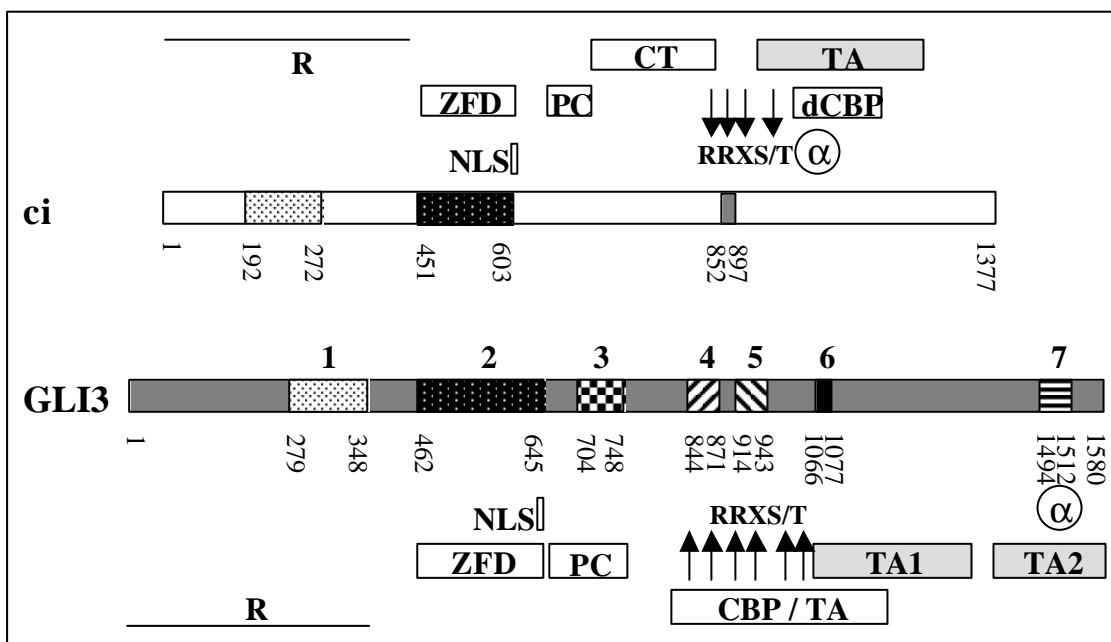


Abb. 7: Schematische Darstellung der Sequenz- und funktionellen Homologie von *Drosophila cubitus interruptus* (*ci*) und dem humanen *GLI3*. Das *ci*-Protein wird durch einen weißen, das *GLI3*-Protein durch einen grauen Balken dargestellt. Die nummerierten Boxen (1-7) im *GLI3*-Protein repräsentieren die Homologiebereiche innerhalb der *GLI*-Genfamilie. Die Lokalisation aller Domänen ist durch die erste und letzte Aminosäure der jeweiligen Region gekennzeichnet. Der

DNA-bindende Bereich (ZFD, Zinkfingerdomäne) befindet sich in Domäne zwei. Innerhalb dieser Zinkfingerregion findet man das Kernlokalisierungssignal (NLS) für beide Proteine. Neben der DNA-Bindungsdomäne besitzt ci noch zwei weitere zu GLI3-homologe Domänen, die eine N-terminal der ZFD gelegen, während die zweite C-terminale Region mit dem GLI3-Rest zwischen Domäne 4 und 5 (Aminosäure 872-913) korrespondiert. Die bisher bekannten strukturellen Motive und funktionellen Eigenschaften sind oberhalb der Proteine angegeben. Für *cubitus interruptus* sind das die reprimierende und aktivierende Region (R und TA), ein Bereich mit einer sauren, amphipatischen Helix (α), die dCBP bindenden Region (dCBP), die Pka-Konsensusphosphorylierungsstellen (RRXS/T), die Region der proteolytischen Spaltstellen und ein Bereich, der für die zytoplasmatische Retention verantwortlich zeichnet (PC und CT). Für GLI3 können zwei unabhängige, transaktivierende Bereiche (TA1 und TA2) detektiert werden. Die Repression (R) wird durch den N-Terminus vermittelt. Außerdem findet sich neben einer CBP-Bindungsstelle (CBP/TA) auch die saure, α -helikale Struktur (α) im C-terminalen Bereich des Proteins. Konsensussequenzen für die PKA-vermittelte Phosphorylierung (RRXS/T) liegen zwischen den Aminosäuren 846 und 1006. Eine putative proteolytische Spaltstelle ist ebenfalls markiert (nach Kalf-Suske *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

1.5 Homologe der Hedgehog-Signalkaskade beim Menschen: Bedeutung bei genetisch bedingten Entwicklungsstörungen und Erkrankungen

Die weit verbreitete Expression der humanen *HEDGEHOG*-Genfamilie in den verschiedensten Geweben läßt erahnen, daß eine Störung innerhalb ihrer Signalwege umfassende Auswirkungen auf die Musterbildung während der Embryogenese haben wird. Zumindest für *SONIC* und *INDIAN* *HEDGEHOG* ist bewiesen, daß sie zum Teil die gleichen Wirkketten nutzen, um entsprechende Zielgene zu regulieren. Die große Anzahl der bisher bekannten, beteiligten Moleküle eines solchen Signalweges, wie auch ihre komplexe Regulation läßt erahnen, daß es zu Störungen auf vielen Ebenen kommen kann. Diese Störungen können dabei sowohl durch Mutationen der einzelnen Teilnehmer, als auch durch Variationen der zusätzlich benötigten Faktoren ausgelöst werden. Die Auswirkungen von Fehlregulationen, ganz gleich ob zu Beginn durch eine Beeinflussung des Startmoleküls *SONIC* *HEDGEHOG*, oder am Ende der Signalkaskade, durch eine Interferenz mit dem Transkriptionsfaktor *GLI*, können helfen, die Interaktionen innerhalb eines solchen komplexen Vorganges besser zu verstehen. Die inzwischen große Anzahl an Erkrankungen, die mit der *HEDGEHOG*-Kaskade in Zusammenhang

stehen, können auch als HEDGEHOG-Signal-assoziierte Erkrankungen (HSD) zusammengefaßt werden (Ruiz i Altaba, 1999).

Dazu gehören unter anderem die sporadischen, als auch die familiären Mutationen im *SONIC HEDGEHOG*-Gen (*SHH*), die Holoprosencephalie (HPE; MIM 236100) auslösen. Dabei handelt es sich um Fehlbildungen von Strukturen, die von der Mittellinie eines Embryos abstammen. Sie betreffen im wesentlichen den Kopf und das Gesicht mit einer sehr weiten Streuung in der Schwere ihrer Ausprägung. Neben Lippen- und Gaumenspalten kommt es zu einer unvollständigen Septierung des ZNS und einem Hypotelorismus, der bis hin zur Ausprägung eines Zyklopeauges führen kann (Dean *et al.*, 1996; Villavicencio *et al.*, 2000). Neben der HPE, weisen neuere Daten auch auf eine direkte Beteiligung von *SHH* an der Entstehung von Tumoren, wie dem Medulloblastom und dem Basalzellkarzinom (BCC), hin. Seine spezifische Expression im Kleinhirn, gekoppelt mit der Beteiligung an apoptotischen Prozessen machen *SHH* zu einem interessanten Kandidaten für die Beteiligung an der Tumorgenese (Sanz-Ezquerro *et al.*, 2000; Taipale *et al.*, 2001). Eine weitere Veränderung innerhalb der SHH-Kaskade betrifft zwar auch das Signalmolekül selbst, aber ausschlaggebend für die Störungen sind in diesem Fall seine lipophilen Modifikationen. Sie sind essentiell, um eine geregelte Signalwirkung zu erzielen. Ein abnormaler Cholesterinmetabolismus beeinflusst neben der Synthese von Steroidhormonen und der Bildung neuer Zellmembranen auch die Sonic HEDGEHOG-Funktion. Das rezessive Smith-Lemli-Opitz Syndrom (SLOS; MIM 270400) ist dabei das bekannteste der durch eine gestörte Cholesterinbiosynthese ausgelösten Fehlentwicklungen. Es zeigt einige klassische Merkmale der HEDGEHOG-assoziierten Erkrankungen, wie Syn- und Polydaktylie, ZNS-Fehlbildungen und HPE (Kelley *et al.*, 1996, Kelley 2000; Villavicencio *et al.*, 2000).

Der Rezeptorkomplex dieser Signalkette, gebildet von PATCHED (PTCH) und SMOOTHENED (SMO) wird mit unterschiedlichen Formen von Neoplasien in Zusammenhang gebracht. Eine Erklärung dieser Beobachtung liegt in der Wirkung von PTCH als Tumorsuppressorgen und in der Wirkung von SMO als ein Protooncogen. Missense-Mutationen innerhalb des *SMO*-Gens führen zu sporadischen Basalzellkarzinomen (BCC; MIM 605462), einer Tumorform, die auch durch *PTCH* induziert wird (Xie *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 1999; Taipale *et al.*, 2001). Daneben zeigt PATCHED aber noch eine Beteiligung an weiteren Tumorformen wie dem Medulloblastom, dem Trichoepitheliom und Karzinomen der Speiseröhre und der Harnblase. PTCH-inaktivierende Mutationen führen zum Gorlin Syndrom, was auch als Basalzellnävus-

Syndrom (BCNS; MIM 109400) bezeichnet wird und sich durch ein erhöhtes Risiko zur Tumorentstehung verschiedenster Herkunft und entwicklungsbedingte Fehlbildungen der Hände, Rippen und Zähne auszeichnet (Hahn *et al.*, 1996; Ruiz i Altaba, 1999; Taipale *et al.*, 2001). Für die Bestandteile des zytoplasmatischen Komplexes in der Hedgehog-Kaskade, der Proteinkinase Fused (Fu), dem Suppressor of Fused (Su(fu)), dem Kinesin-verwandte Molekül Costal-2 (Cos-2) und dem Transkriptionsfaktor Gli, sind bis auf Costal-2 humane Homologe bekannt. Abgesehen von den GLI-Proteinen ist aber bisher für keine dieser Komponenten eine Assoziation mit einer Erkrankung gezeigt worden. Die Beteiligung der GLI-Proteine an der Entstehung von Fehlbildungen und Krankheiten ist sehr komplex und wird deshalb in einem gesonderten Kapitel beschrieben. Der letzte Teilnehmer bei der Signalwirkung von SHH, der im humanen System nachweislich zu Fehlregulationen führt, ist der Ko-Aktivator CBP. Mutationen, die eine Halbierung der Gendosis (Haploinsuffizienz) erzeugen, führen zum Rubinstein-Taybi Syndrom (RTS; MIM 180849), wobei es sich um eine embryonale Fehlentwicklung handelt (Petrij *et al.*, 1995). Sie zeichnet sich durch breite Daumen und Großzehen, Kleinwuchs, verzögerte Knochenentwicklung und Wirbelanomalien, Gesichtsfehlbildungen, mentale Retardierung und ein erhöhtes Tumorrisiko aus (Ruiz i Altaba, 1999; Villavicencio *et al.*, 2000).

Alle erwähnten Erkrankungen und ihre teilweise überlappenden Symptome weisen auf einen gemeinsamen Ursprung bei der Entstehung hin. Gleichzeitig ist aber auch eine erstaunliche Heterogenität in der Ausprägung der HEDGEHOG-assoziierten Krankheiten (HSD) zu beobachten, die sich selbst in der Variabilität der Symptome, die durch einen Faktor wie z.B. SHH oder CBP ausgelöst werden, widerspiegelt. Die *GLI*-Genfamilie der Transkriptionsfaktoren stellt dabei keine Ausnahme dar, denn hier findet sich das weite Spektrum an Symptomen und Syndromen, die die unterschiedlichen Familienmitglieder, oder aber ein einzelnes Familienmitglied auslösen, wieder.

1.5.1 Beteiligung von *GLI3* und seiner Genfamilie an der Entstehung von Fehlentwicklungen und Erkrankungen

GLII, ursprünglich durch seine deutlich erhöhte Expression in Glioblastoma entdeckt, kann als Oncogen klassifiziert werden, weil es zusammen mit dem *Adenovirus* E1A eine transformierende Wirkung auf Zellen hat. Inzwischen sind noch weitere Assoziationen zu Tumorerkrankungen, wie dem Rhabdomyosarcom, Osteosarcom, Basalzellkar-

zinom und dem B-Zell Lymphom bekannt (Werner *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1999). Entwicklungsbedingte Defekte durch eine Fehlregulation von *GLI1* beim Menschen konnten bisher noch nicht gezeigt werden. Die deregulierte Gli1-Expression in transgenen Mäusen weist allerdings auf eine Beteiligung an Entwicklungsdefekten hin (Yang *et al.*, 1997). Neben den für *Gli2* bekannten Mausdaten, die seine Beteiligung an der Entwicklung von Skelettstrukturen, Gliedmaßen und Atmungsorganen zeigen, sind bisher keine weiteren Fakten bekannt, die auf eine Beteiligung an einer Fehlentwicklung oder Erkrankung im Menschen hinweisen (Mo *et al.*, 1997; Büscher *et al.*, 1998; Motoyama *et al.*, 1998; Schweitzer *et al.*, 2000). *GLI3* stellt wohl das am besten untersuchte Mitglied dieser Genfamilie dar. Neben großen chromosomalen Veränderungen wie Translokationen und Deletionen im Bereich dieses Gens, sind auch Punktmutationen detektiert worden, die einen Einfluß auf die *GLI3*-Funktion und damit auf die Signalweiterleitung von SONIC HEDGEHOG haben (Vortkamp *et al.*, 1991; 1992; Radhakrishna *et al.*, 1997; 1999; Wild *et al.*, 1997; Kalff-Suske *et al.*, 1999). Erstaunlicherweise haben aber beide Arten der Veränderungen die gleiche phänotypische Konsequenz, denn sie führen zum autosomal dominanten Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom (GCPS; MIM 175700). Es ist gekennzeichnet durch überwiegend präaxiale Polydaktylie der Füße sowie prä-und/oder postaxiale Polydaktylie der Hände, Syndaktylie an Händen und Füßen, verbreiterte Daumen und Großzehen, typische Gesichts- und Schädelanomalien wie prominente Stirn, Hypertelorismus und einen Makrocephalus. Die Tatsache der gleichen phänotypischen Ausprägung legt die Frage nahe, worin die gemeinsame Grundlage von Translokation, Deletion und Punktmutation liegt, die identische Fehlbildungen induzieren. Zwei der in GCPS-Patienten detektierten Translokationen unterbrechen die chromosomale Region im ersten Drittel der kodierenden Sequenz, während eine dritte ihren Bruchpunkt 10 kb 3' des Gens hat und damit *GLI3* selbst nicht betrifft. Die beschriebenen Deletionen eliminierten die entsprechende Region auf 7p13 (Wagner *et al.*, 1990; Vortkamp *et al.*, 1991). Für den Translokationsbruchpunkt außerhalb des *GLI3*-Gens kann man eine regulatorische Wirkung postulieren, die zur fehlenden Expression eines Allels führt. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch die Mausmutanten *Extra Toes (Xt)*, die dem Greig-Phänotyp ähnliche Fehlbildungen repräsentieren und als Mausmodell für diese Entwicklungsstörung dienen (Johnson, 1967). Bei der *Xt^J*-Mutante handelt es sich um eine intragenische Deletion, die mit ihrem 5' Ende im Intron innerhalb des ersten Zinkfingers liegt und sich mit dem 3' Bereich bis kurz hinter das C-terminalen Ende des *Gli3* Gens erstreckt. Damit ist ein Allel des Gens bis auf das

5' Ende nicht mehr vorhanden. Die Expression dieses verbleibenden Restes ist bei RNA-Analysen von homozygoten Tieren nicht nachweisbar, so daß man auch hier bei Heterozygoten von halber Gendosis ausgehen kann (Hui *et al.*, 1993). Eine zweite *Xt*-Mutante, *Xt^H*, ist gekennzeichnet durch eine 80 kb überspannende Deletion im 5' Bereich des *Gli3*-Gens, die die der *Xt^J*-Mutante nicht überlappt. Auch für diese genetische Veränderung zeigen die Heterozygoten eine reduzierte *Gli3*-Expression von ca. 50% (Schimmang *et al.*, 1992). Eine zu *Xt* allelische Mausmutante ist die rezessive *anterior digit deformity (add)*, begründet durch die Integration eines Transgens 40 kb vor der kodierenden Region von *Gli3*. Sie zeigt nur Fehlbildungen im anterioren Bereich der Vorderextremitäten, was möglicherweise durch die Wirkung einer nur teilweisen Inaktivierung des einen *Gli3*-Allels zu erklären ist (Pohl *et al.*, 1990).

Punktmutationen mit der phänotypischen Konsequenz des GCPS können über das gesamte Gen verteilt detektiert werden. Bei ihnen handelt es sich überwiegend um Nonsense- oder Frameshiftmutationen, deren Veränderungen zu keinem vollständigen Protein mehr führen. Bei allen erwähnten Veränderungen geht man davon aus, daß sie zu einer Halbierung der Gendosis (Haploinsuffizienz) führen, wodurch auch nur etwa die Hälfte an Protein gebildet wird. Missense-Mutationen hingegen, die ebenfalls in Zusammenhang mit GCPS detektiert wurden, führen zu keinem vorzeitigen Abbruch in der Aminosäurekette. Eine Haploinsuffizienz im Sinne der Halbierung der Proteinmenge kann in diesen Fällen nicht als Ursache für die phänotypische Ausprägung der Erkrankung angesehen werden. Die Missense-Mutationen sind vielmehr als funktionelle Haploinsuffizienzen zu bezeichnen. Obwohl die Sequenzveränderung nicht zu einer Verkürzung des Proteins vom betroffenen Allel führt, ist die mutierte Form nicht mehr in der Lage, die natürliche Funktion des Proteins auszuüben. Dies führt zu einer Halbierung der Proteinfunktion, deren Auswirkungen mit einer Gen-Haploinsuffizienz offensichtlich vergleichbar sind.

Eine noch schwieriger zu erklärende Tatsache ist die Beobachtung, daß Punktmutationen im *GLI3*-Gen mit noch drei weiteren Syndromen einhergehen. Zum einen das autosomal dominante Pallister-Hall Syndrom (PHS; MIM 146510), dessen klinische Zeichen ein hypothalamisches Hamartom, zentrale oder postaxiale Polydaktylie, Syndaktylie, Anusatresie, faciale Abnormitäten und eine gelegentliche Assoziation mit Holoprosencephalie und axialen Skelettfehlbildungen sind (Kang *et al.*, 1997; Villavicencio *et al.*, 2000). Zum anderen die Syndrome der Postaxialen Polydaktylie A (PAP-A; MIM174200) und der autosomal dominanten Präaxiale Polydaktylie Typ IV (PPD-IV;

MIM 174700) (Radhakrishna et al., 1997; 1999). All diese Erkrankungen zeichnen sich durch isolierte Formen der Polydaktylie aus, wobei sich in PAP-A ein zusätzlicher Finger entwickelt, der funktionell und mit dem 5. Finger assoziiert oder selbständig ist, während bei PAP-B der zusätzliche Finger oft als Hautanhängsel (Postminimus) ausgebildet wird und in der Regel keine Funktion hat.

Die Gemeinsamkeit aller in diesem Abschnitt beschriebenen Syndrome ist, daß sie Entwicklungsstörungen bezüglich der Gliedmaßen zeigen. Die durch ähnliche Mutationen im gleichen Gen hervorgerufenen, zum Teil sehr unterschiedlichen Syndrome lassen vermuten, daß das funktionelle Zusammenspiel zwischen Transkriptionsfaktor und der dazugehörigen Kaskade den Ausschlag bringt, welche der Fehlbildungen ausgeprägt wird. In Abbildung 8 sind die im *GLI3*-Gen detektierten Mutationen mit der entsprechenden phänotypischen Ausprägung zusammengefaßt. Genveränderungen, die nicht zwingend mit einer Haploinsuffizienz assoziiert sind, wie z.B. Missense-Mutationen, werden farbig markiert dargestellt. Sie stehen im Mittelpunkt der funktionellen Analysen innerhalb dieser Arbeit.

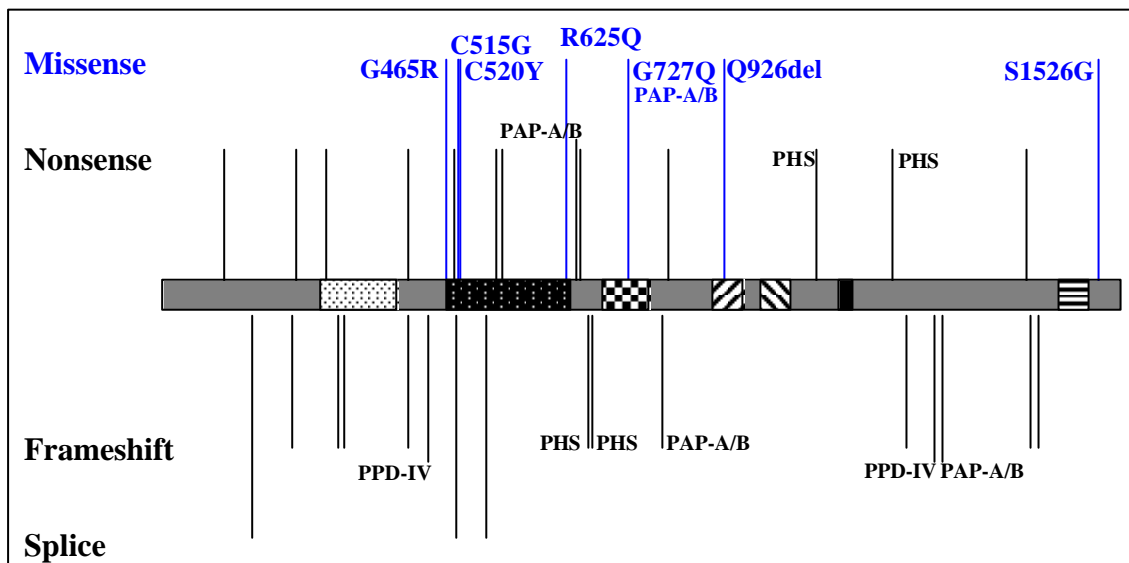


Abb. 8: Zusammenfassung der bisher bekannten *GLI3*-Mutationen. Das *GLI3*-Protein wird schematisch durch den grauen Balken repräsentiert. Die unterschiedlichen Mutationstypen sind auf der linken Seite dargestellt. Die Bereiche der Proteinveränderungen werden durch vertikale Striche angedeutet. Die neben dem GCPS (alle nicht markierten Striche) mit *GLI3*-Mutationen assoziierten Syndrome, sind jeweils neben dem Ort ihrer Mutation angegeben (PHS, PPD-IV und PAP-A/B). Missense-Mutationen sind mit ihrer Aminosäureposition im Protein und dem entsprechenden Austausch, als Einzelbuchstabencode für die jeweiligen Aminosäuren blau dargestellt.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor *GLI3* stellt das Kandidatengen für die unterschiedlichen Morphopathien, GCPS, PHS, PPA-A, PPD-IV und PAP-A/B dar. Neben Translokationen und Deletionen im Gen, die mit dem Greig-Syndrom in Zusammenhang stehen, sind es vor allem die in den letzten Jahren detektierten Punktmutationen, die für die Ausprägung der beobachteten Fehlbildungen verantwortlich zeichnen. Eine der interessantesten Fragen in dieser Beziehung lautet, wie es möglich ist, daß ein einzelnes Gen solch differenzierte Ausprägungen verursachen kann. Eine erste Vermutung, daß die Position der Mutation innerhalb des Gens mit dem Typ der Morphopathie alleine ausschlaggebend ist, hat sich mit der zunehmenden Anzahl von detektierten *GLI3*-Genveränderungen nicht bestätigt (Biesecker, 1997; Kalff-Suske *et al.*, 1999). Die Mutationen sind unabhängig vom Phänotyp über das Gen verteilt, so daß keine offensichtliche Genotyp-Phänotyp Korrelation auszumachen ist.

Um zum Verständnis beizutragen, weshalb beim Menschen in der Regel fünf Finger entstehen, deren Identität vom Daumen bzw. der Großzehe zum kleinen Finger oder Zeh immer von der anterioren zur posterioren Richtung verläuft, sollten funktionelle Studien mit dem *GLI3*-Protein durchgeführt werden. Zwei Dinge beeinflussten die Planung der Experimente essentiell. Auf der einen Seite waren das die Befunde, die durch funktionelle Untersuchungen mit dem *GLI*-Homolog *cubitus interruptus* erzielt wurden (Aza-Blanc *et al.*, 1997; 1999). Auf der anderen Seite galt es zu ermitteln, ob detektierte Punktmutationen, die nicht zu einem vorzeitigen *GLI3*-Kettenabbruch führen (*GLI3*-Missense-Mutationen), zu funktioneller Haploinsuffizienz des *GLI3* Gens führen (Kalff-Suske *et al.*, 1999). Diese fehlende Funktion wäre eine Erklärungsmöglichkeit für den, auch bei diesen Sequenzveränderungen vorhandenen Phänotyp.

Der Nachweis des Einflusses von Missense-Mutationen auf die primären Eigenschaften des Transkriptionsfaktors *GLI3* stellte im wesentlichen das Aufgabengebiet dieser Arbeit dar. Eine bedeutende Funktion von *GLI3* als TF ist die DNA-Bindung. Diese Fähigkeit sollte für das Wildtypprotein gezeigt werden, um dann die Frage klären zu können, ob nicht-trunkierende Mutationen innerhalb der DNA-bindenden Zinkfingerdomäne einen Einfluß auf diese Eigenschaft nehmen. Neben der DNA-Bindung ist die Aktivierung bzw. Repression von Zielsequenzen ebenfalls eine der primären Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren. Zur Testung dieser Funktion sollte ein Analysesystem etabliert werden, in dem dann sowohl der Wildtyp als auch mutierte *GLI3*-Formen einge-

setzt wurden. Hier waren vor allem die Missense-Mutationen von Interesse, die zum einen in den nachweislich vorhandenen transaktivierenden Domänen (TA₁ und TA₂, Kalff-Suske et al., 1999) von GLI3 lagen und zum anderen sich in Regionen des Proteins befanden, denen bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Daneben wurden aber auch Fragen der subzellulären Lokalisation und deren mögliche Beeinflussung durch posttranslationale Modifikationen aufgeworfen. Hinweise, daß diese bei der Regulation von GLI3 eine Bedeutung haben könnten, kamen von seinem Homolog in *Drosophila* (*ci*). *Cubitus interruptus* wird über posttranslationale Phosphorylierung der Spaltung in eine Repressorform (*ci*^{Rep}) zugänglich gemacht. Diese zeigt eine überwiegende Kernlokalisierung, während das gesamte Protein ausschließlich im Zytoplasma nachweisbar ist. Um Fragen der Modifikation und Lokalisation für GLI3 zu klären, wurden spezifische Antikörper generiert, um den Nachweis der Interaktionen und Lokalisationen zu erbringen. Außerdem dienten GLI3-GFP-Fusionsproteine, die identifizierte Kettenabbruchmutationen nachahmen sollten, dazu, das Verhalten dieser GLI3-Deletionsmutanten bezüglich der subzellulären Lokalisation zu klären.

Das grundsätzliche Ziel dieser Arbeit war, die Wirkungsweisen von Missense-Mutationen besser verstehen zu können und möglicherweise eine Antwort darauf zu finden, wie unterschiedliche Mutationen im gleichen Gen zu einer Ausprägung verschiedenster Phänotypen, wie Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom, Pallister-Hall Syndrom, Postaxiale Polydaktylie A und Präaxiale Polydaktylie Typ IV führen können.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg); BIO RAD (München); Boehringer (Mannheim) jetzt Roche Diagnostics (Mannheim); Difco (USA); Fluka (UK); Fresenius (Oberursel); Gibco BRL (Eggenstein); Merck (Darmstadt); Ratiopharm (Ulm); Riedel-de-Haën (Seelze); Roth (Karlsruhe); Serva (Heidelberg); Sigma (München).

2.1.2 Enzyme, Nukleotide und DNA-Größenstandards

Alle Restriktions- und Modifikationsenzyme wurden von einer der folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg); Boehringer (Mannheim) jetzt Roche Diagnostics (Mannheim); Gibco BRL (Eggenstein); MBI Fermentas (St. Leon-Rot); New England Biolabs (Schwalbach); Stratagene (Heidelberg). Einzelne Nukleotide oder Nukleotidmischungen wurden in HPSF®-Qualität von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) und von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

DNA-Größenstandards:

pUC-Mix (Marker 8)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Marker III (Lambda-DNA/ <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i>)	Roche Diagnostics, Mannheim
1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.3 Medien, Nährböden und Standardlösungen

2.1.3.1 Nährmedien, Nährböden und Antibiotikallösungen für die Bakterienkulturen

Zur Sterilisation wurden die Medien 30 min bei 123°C autoklaviert oder steril filtriert.

LB-Flüssigmedium (Luria-Bertani)	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH 7,5 mit 1 M Tris (pH 7,5) einstellen	
LB-Agar	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Bacto-Agar	20 g/l
pH 7,5 mit 1 M Tris (pH 7,5) einstellen		
SOB-Medium	Bacto-Trypton	20 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 ml 1 M MgCl ₂ und 10 ml 1 M MgSO ₄ (steril filtriert)	
SOC-Medium	Bacto-Trypton	20 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 ml 1 M MgCl ₂ , 10 ml 1 M MgSO ₄ und 20 ml 20% (w/v) Glucose (alles zuvor steril fil- triert)	

LB ^{Amp}	LB-Flüssigmedium (s.o.)	
	Ampicillin	0,05 mg/ml
LB ^{Kan}	LB-Flüssigmedium (s.o.)	
	Kanamycin	0,03 mg/ml
LB ^{Chloramp}	LB-Flüssigmedium (s.o.)	
	Chloramphenicol	0,025 mg/ml
Ampicillin Stocklösung		100 mg/ml
Chloramphenicol Stocklösung		34 mg/ml in 100% EtOH
Kanamycin Stocklösung		20 mg/ml
IPTG (Isopropylthiogalaktosid) Stocklösung		100 mM

2.1.3.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkulturen

Zur Sterilisation wurden die Lösungen steril filtriert.

RPMI Medium, 10% komplett	RPMI 1640 ohne Glutamin	500 ml
	Fötale Kälberserum (FCS)	50 ml
	100X Antibiotika	5 ml
	100X	
	nichtessentielle Aminosäuren	5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
RPMI Medium mit HEPES, 4% komplett	RPMI 1640 mit HEPES	500 ml
	Fötale Kälberserum (FCS)	20 ml
	100X Antibiotika	5 ml
	100X	
	nichtessentielle Aminosäuren	5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml

DMEM Medium, 10% komplett	DMEM	500 ml
	Fötale Kälberserum (FCS)	50 ml
	100X Antibiotika	5 ml
	100X	
	nichtessentielle Aminosäuren	5 ml
DMEM Medium/Nut.Mix.F-12, 10% kom.	DMEM/Nut.Mix.F-12	500 ml
	Fötale Kälberserum (FCS)	50 ml
	100X Antibiotika	5 ml
	100X	
	nichtessentielle Aminosäuren	5 ml
100X Antibiotika	Gibco BRL, Eggenstein	
Penicillin (10.000 IE/ml)		
Streptomycin (10.000 µg/ml)		
RPMI 1640 ohne Glutamin	Roche Diagnostics, Mannheim	
RPMI 1640 mit HEPES ohne Glutamin	Roche Diagnostics, Mannheim	
DMEM (Dulbecco`s modifiziertes Eagles Medium)	Gibco BRL, Eggenstein	
DMEM/Nut.Mix.F-12	Gibco BRL, Eggenstein	
MEM (Minimal Essential Medium)	Gibco BRL, Eggenstein	
OPTI-MEM (Serumreduziertes Medium)	Gibco BRL, Eggenstein	
L-Glutamin (200 mM)	BIOWhitaker, Walkersville, USA	
Einfriermedium	BIOWhitaker, Walkersville, USA	
PBS	Roche Diagnostics, Mannheim	

Trypsin (0,05%)	Serva, Heidelberg	
2.1.3.3 Standardlösungen und Puffer		
APS	Ammoniumpersulfat in H ₂ O (w/v)	10%
Agarosegelladepuffer 6X	Ficoll Bromphenolblau und / oder Xylencyanol	15% 0,25% 0,25%
PBS	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O NaH ₂ PO ₄ NaCl pH 7,5	80 mM 20 mM 100 mM
Sevag	Chloroform:Isoamylalkohol (v/v)	24:1
TAE-Puffer 50X	Tris EDTA pH 7,5-8,0 einstellen mit 100% Essigsäure	2 M 0,05 M
TBE-Puffer 5X	Tris Borsäure EDTA	0,45 M 0,45 M 10 mM
TE-Puffer	Tris-HCl EDTA pH 8,0 einstellen mit 1 M Salzsäure	10 mM 1 mM

Spezielle Puffer und Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

2.1.4 Organismen

2.1.4.1 Bakterienstämme

DH5 α

Genotyp: F⁻, ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1* (Gibco BRL).

Für die Transformation zur Vermehrung von Plasmiden wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α TM Competent Cells eingesetzt.

XL1-Blue

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [(F' *proAB lacI^qZAM15 Tn 10* (Tet^r)] (Stratagene).

Für die Transformation der *in vitro* mutagenisierten DNAs wurden *Epicurian Coli*® XL1-Blue Supercompetent Cells eingesetzt.

BL21(DE3)pLysS

Genotyp: *E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal λ (DE3)* [pLysS Cam^r] (Stratagene).

Für die „high level“ Expression und Induktion von bakteriell exprimierten, rekombinanten Proteinen wurde der Bakterienstamm *Epicurian Coli*® BL21(DE3)pLysS Competent Cells eingesetzt.

SG 13009 [pREP 4]

Genotyp: *E. coli* K12 (*Nal^s, Str^s, Rif^s, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺*). (Labor Prof. G. Suske, IMT, Marburg)

Dieser Bakterienstamm wurde für die Expression und Induktion von GLI3 Zinkfinger Peptiden eingesetzt.

2.1.4.2 Zelllinien

NCI-H441

Herkunft: Clarazellen, nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)

Quelle: American Type Culture Collection (ATCC HTB-174)

Medium: RPMI mit HEPES, 4% FCS

GLI3 mRNA Expression nicht nachweisbar im Northern Blot (Jacobsen, 1996).

NCI-H157

Herkunft: Großzell-Karzinom, nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)

Quelle: NCI (National Cancer Institute, Maryland)

Medium: RPMI, 10% FCS

GLI3 m-RNA Expression nicht nachweisbar im Northern Blot (Jacobsen, 1996).

NCI-H661

Herkunft: Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)

Quelle: American Type Culture Collection (ATCC HTB-183)

Medium: RPMI, 10% FCS

Deutliche Expression von *GLI3* m-RNA im Northern Blot nachweisbar (Jacobsen, 1996).

U2-OS

Herkunft: Osteosarcomazellen, epitheliale Knochenzellen

Quelle: American Type Culture Collection (ATCC HTB-96)

Medium: DMEM, 10% FCS

Deutliche Expression von *GLI3* m-RNA im Northern Blot zu detektieren (Topp, 1997).

Hek 293

Herkunft: Humane, embryonale Nierenfibroblasten

Quelle: Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. G. Suske, IMT, Marburg, zur Verfügung gestellt (Bezeichnung: ATCC CRL-1573).

Medium: DMEM, Nut Mix F-12, 10% FCS

COS-7

Herkunft: African, green monkey Nierenfibroblasten

Quelle: American Type Culture Collection (ATCC CRL-1651)

Medium: DMEM, 10% FCS

Deutliche Expression von *GLI3* m-RNA im Northern Blot nachweisbar (Topp, 1997).

2.1.5 Plasmide und Expressionskonstrukte

Die Plasmide, die als Ausgangsvektoren bzw. Insertquelle für Klonierungen in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Plasmidname	Plasmidtyp	Größe	Referenz / Herkunft
pET3a	Prokaryontische Expressionsvektoren	4,6 kb	Novagen
pRSETA		2,9 kb	Invitrogen
pRSETB		2,9 kb	Invitrogen
pEGFP-N1, -N2, -N3	Eukaryontische GFP (Green Fluorescence Protein) Fusionsprotein-Expressionsvektoren	4,7 kb	CLONTECH
pEGFP-C1		4,7 kb	CLONTECH
pGLI3-bs2	<i>GLI3</i> cDNA Klon	8,0 kb	Ruppert <i>et al.</i> , 1990

Tab. 1: Zur Klonierung verwendete Plasmide

Expressionskonstrukte mit der dazugehörigen Klonierungsstrategie und sonstige Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Plasmidbezeichnung	Klonierungsstrategie*	Referenz
pG5E1bLuc	1: pG5E1bCatSV40en (Lillie and Green, 1989) <i>HindIII</i> (Klenow behandelt)- <i>BamHI</i> gespalten, 130 bp Fragment ligiert zu 2: pGL3-Basic, <i>BglIII-SmaI</i> gespalten	Topp 1997
8X3'GLI-BS Luc		Sasaki <i>et al.</i> , 1999
8X3' MutGLI-BS Luc		Sasaki <i>et al.</i> , 1997

Plasmidbezeichnung	Klonierungsstrategie*	Referenz
pPTCH1 Reporterkonstrukt	1: 4,3 kb 5' regulatorische Region von <i>PTCH1</i> in 2: pGL3-Basic	Shin <i>et al.</i> , 1999 (freundlichst überlassen von R. Toftgard)
pQE9-GLI3-WT-ZF Bakterielles Expressionskonstrukt für die GLI3 Zinkfinger Domäne	1: GLI3 aa 462-645 mit PCR amplifiziert, <i>BamHI-HindIII</i> gespalten, ligiert zu 2: pQE9, <i>BamHI-HindIII</i> gespalten	Vortkamp <i>et al.</i> 1995
pET3aGLI3/176-554 Bakterielles Expressionskonstrukt des N-Terminus von GLI3 zur Gewinnung GLI3 spezifischer α -N-terminaler Ak	1: pGLI3-bs2, <i>NdeI</i> gespalten, 1137 bp Fragment (GLI3 aa 158-537) ligiert zu 2: pET3a, <i>NdeI</i> gespalten	diese Arbeit
pRSETBGLI3/1044-1580 Bakterielles Expressionskonstrukt des C-Terminus von GLI3 (Domäne 6+7) zur Gewinnung GLI3 spezifischer α -C-terminaler Ak	1: pGAL4-GLI3 ¹⁰⁴⁴⁻¹⁵⁸⁰ , <i>EcoRI</i> gespalten, 1871 bp Fragment (GLI3 aa 1044-1580) ligiert zu 2: pRSETB, <i>EcoRI</i> gespalten	diese Arbeit
pRSETAGLI3/1321-1580 Bakterielles Expressionskonstrukt des C-Terminus von GLI3 (Domäne7) zur Gewinnung GLI3 spezifischer α -C-terminaler Ak	1: pGLI3-bs2, <i>KpnI-EcoRI</i> gespalten, 1039 bp Fragment (GLI3 aa 1321-1580) ligiert zu 2: pRSETA, <i>KpnI-EcoRI</i> gespalten	diese Arbeit
pGAL4		Dennig <i>et al.</i> , 1996 (freundlichst überlassen von G.Suske)
pGAL4-Sp1A		Southgate and Green, 1991 (freundlichst überlassen von G.Suske)
pGAL4-GLI3¹⁰⁴⁴⁻¹⁵⁸⁰	1: pGLI3-bs2, <i>BssSI-ClaI</i> gespalten, 1860 bp Fragment nach Linkerligation (<i>EcoRI</i> 8 ^{mer}) mit 2: pGAL4-Sp1A, <i>EcoRI</i> gespalten, fusioniert	Topp, 1997; Kalff-Suske <i>et al.</i> , 1999
pGAL4-GLI3¹³⁷⁶⁻¹⁵⁸⁰	1: pGLI3-bs2, <i>HindIII-EcoRI</i> gespalten, 876 bp Fragment nach Linkerligation (<i>EcoRI</i> 12 ^{me}) mit 2: pGAL4-Sp1A, <i>EcoRI</i> gespalten, fusioniert	Topp, 1997; Kalff-Suske <i>et al.</i> , 1999
pGAL4-GLI3¹⁰⁴⁴⁻¹³²²	1+2: pGAL4-GLI3 ¹⁰⁴⁴⁻¹⁵⁸⁰ , <i>KpnI-XbaI</i> gespalten, Klenow behandelt, religiert	Kalff-Suske <i>et al.</i> , 1999
fpn 1-396 Vektor zur eukaryontischen Expression; GLI3-GFP Fusionsprotein	1: pGLI3-bs2, <i>BamHI</i> gespalten, 1238 bp Fragment (GLI3 aa 1-396) ligiert zu 2: pEGFP-N2, <i>BamHI</i> gespalten	Kalff-Suske, 1998 unpubliziert

Plasmidbezeichnung	Klonierungsstrategie*	Referenz
fpn 1-422 GLI3-GFP Fusionsprotein	1: pGLI3-bs2, <i>SacI-PstI</i> gespalten, 1320 bp Fragment (GLI3 aa 1-422) ligiert zu 2: pEGFP-N3, <i>SacI-PstI</i> gespalten	Kalff-Suske, 1998 unpubliziert
fpn 1-667 GLI3-GFP Fusionsprotein	1: pGLI3-bs2, <i>EagI</i> gespalten, 2000 bp Fragment (GLI3 aa 1-667) ligiert zu 2: pEGFP-N2, <i>BspI20I</i> gespalten	Kalff-Suske, 1998 unpubliziert
fpn 1-828 GLI3-GFP Fusionsprotein	1: pGLI3-bs2, <i>SacI-SmaI</i> gespalten, 2537 bp Fragment (GLI3 aa 1-828) ligiert zu 2: pEGFP-N3, <i>SacI-SmaI</i> gespalten	Kalff-Suske, 1998 unpubliziert
fpn 1-1100 GLI3-GFP Fusionsprotein	1: pGLI3-bs2, <i>SacI-SwaI</i> gespalten, 3353 bp Fragment (GLI3 aa 1-1100) ligiert zu 2: pEGFP-N3, <i>SacI-SmaI</i> gespalten	Kalff-Suske, 1998 unpubliziert
fpn 1-1522 GLI3-GFP Fusionsprotein	1a: pGLI3-bs2, <i>BspI20I-HindIII</i> gespalten, 438 bp Fragment (GLI3 aa 1376-1580) ligiert zu 2a: pEGFP-N1, <i>BspI20I-HindIII</i> gespalten (entspricht fpn 1376-1522) 1b: pGLI3-bs2, <i>SacI-HindIII</i> gespalten, 4179 bp Fragment (GLI3 aa 1-1376) ligiert zu 2b: fpn 1376-1522, <i>SacI-HindIII</i> gespalten	Kalff-Suske, 1998 unpubliziert; diese Arbeit
fpn 824-1100 GLI3-GFP Fusionsprotein	1+2: fpn 1-1100, <i>EcoRI-BspI20I</i> gespalten, 2412 bp Fragment (GLI3 aa 1-823) entfernt, Klenow behandelt, religiert	diese Arbeit
fpc 18-828 GFP-GLI3 Fusionsprotein	1: pGLI3-bs2, <i>EcoRI-SmaI</i> gespalten, 2432 bp Fragment (GLI3 aa 18-828) ligiert zu 2: pEGFP-C1, <i>EcoRI-SmaI</i> gespalten	Kalff-Suske, 1998 unpubliziert
fpc 18-396 GFP-GLI3 Fusionsprotein	1+2: fpc 18-828, <i>BamHI</i> gespalten, 1300 bp Fragment (GLI3 aa 397-828) entfernt, Klenow behandelt, religiert	diese Arbeit
fpc 18-667 GFP-GLI3 Fusionsprotein	1: pGLI3-bs2, <i>EcoRI-EagI</i> gespalten, 1884 bp Fragment (GLI3 aa 18-667) ligiert zu 2: pEGFP-C1, <i>EcoRI-BspI20I</i> gespalten	diese Arbeit

Plasmidbezeichnung	Klonierungsstrategie*	Referenz
fpc 18-1100 GFP-GLI3 Fusionsprotein	1: pGLI3-bs2, <i>EcoRI-SmaI</i> gespalten, 3245 bp Fragment (GLI3 aa 18-1100) ligiert zu 2: pEGFP-C1, <i>EcoRI-SmaI</i> gespalten	diese Arbeit
fpc 18-1549 GFP-GLI3 Fusionsprotein	1: pGLI3-bs2, <i>EcoRI-Eco47III</i> gespalten, 4544 bp Fragment (GLI3 aa 18-1549) ligiert zu 2: pEGFP-C1, <i>EcoRI-SmaI</i> gespalten	diese Arbeit
fpc 586-1549 GFP-GLI3 Fusionsprotein	1+2: fpc 18-1549, <i>BglII</i> gespalten, 1756 bp Fragment (GLI3 aa 18-585) entfernt, Klenow behandelt, religiert	diese Arbeit
fpc GLI3dN (428-1549) GFP-GLI3 Fusionsproteinen	1+2: fpc 18-1549, <i>EcoRI-BstEII</i> gespalten, 1212 bp Fragment (GLI3 aa 18-427) entfernt, Klenow behandelt, religiert	diese Arbeit
pCMVdEGFP-GLI3c Säuger-Expressionsvektor für Gesamt-GLI3	1: pGLI3-bs2, <i>SpeI-Sall</i> gespalten, 5100 bp Fragment (GLI3 cDNA) ligiert zu 2: pEGFP-C1, <i>NheI-Sall</i> gespalten (800 bp GFP Fragment damit gleichzeitig entfernt)	Kalff-Suske, 1998 unpubliziert
pCMVdEGFP-GLI1c Säuger-Expressionsvektor für Gesamt-GLI1	1: pGLI1K12, <i>HindIII-NotI</i> gespalten, 3600 bp Fragment (GLI1 komplett) ligiert zu 2: pEGFP-N1, <i>HindIII-NotI</i> gespalten, (800 bp GFP Fragment damit gleichzeitig entfernt)	Kalff-Suske, 1998 unpubliziert
pCMV-dGFP Säuger-Expressionsvektor ohne GFP	2: pEGFP-C1, <i>AgeI-XmaI</i> gespalten, 800 bp GFP Fragment entfernt, religiert	diese Arbeit
pMID1 Säuger-Expressionsvektor für MID1 Protein		Schweiger, S. et al., 1999 (freundlichst überlassen von S. Schweiger)
pBluescript II Ks (pBS II)		Stratagene
pRL-TK		Promega
pBK-CMV		Stratagene

Tab. 2: Reporterengenkonstrukte, prokaryontische und eukaryontische Expressionskonstrukte und sonstige Plasmid-DNAs für alle durchgeführten Studien. *Bei der Klonierungsstrategie kennzeichnet 1: Insert mit Behandlung und 2: Vektor mit Behandlung. Die Markierung a und b wurde gewählt, weil bei einem eukaryontischen Expressionskonstrukt zwei Klonierungsschritte bis zur Generierung des endgültigen Konstruktes nötig waren. 1+2 kennzeichnet Klonierungen, wo ein Aus-

gangsplasmid nach Entfernung eines Fragmentes religiert und als neues Konstrukt verwendet wurde. fpn stellt die Bezeichnung für die eukaryontischen Expressionsvektoren dar, die Fusionsproteine an den N-Terminus von GFP gekoppelt generieren, während fpc die C-terminalen GFP-Fusionen kennzeichnet.

2.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den Tabellen 3a, b und c aufgeführt.

Die Sequenzierprimer für die Überprüfung des korrekten Leseraters nach Klonierung sind in Tabelle 3a angegeben.

Primer	Exon / nt Position in cDNA *	5'® 3' Sequenz der Primer	Matrizen
T7prom		CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCA C	pET und pRSET Expressionsklone
EGFP-N		CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G	pEGFP-N1-3 Expressionsklone
EGFP-C		CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G	pEGFP-C1 Expressionsklone
GLI-11 for	Ex XI / 1507 bis 1527	AAC GAC CAT ATT CAT GGA GAG	fpn 1-667
GLI-11 rev	Ex XI / 1624 bis 1643	CAT TTG TGA GGC TCC TCG CC	pQE9-GLI3-WT-ZF; pQE9-GLI3- Mut515, -Mut520, -Mut625, -Mut465- ZF; pCMVdEGFP-GLI3c-Mut465
Ex 13-2 for	Ex XIII / 1898 bis 1917	GCC CAG AGG CTC ATG TCA CC	pCMVdGFP-GLI3c-Mut707, -Mut727
Ex 15-3 for	Ex XV / 2579 bis 2597	GCA GCC GCC GCT CCT CAG G	pCMVdGFP-GLI3c-Mut926
Ex 15-16 for Ex 15-16 rev	Ex XV / 4503 bis 4523 Ex XV / 4759 bis 4778	GGT ACA GAT TGA CTT CGA TGC GAT TTC CGT TGG TTG CAG TC	pGAL4-GLI3 ^{1044-1580-Mut1526} ; pGAL4-GLI3 ^{1376-1580-Mut1526}
Ex 14-3 for Ex 15-1 rev	Ex XIV / 2306 bis 2325 Ex XV / 2549 bis 2567	CGG CAG GGA CCA AAT GGA TG GAG CTG ATG GTG CTG GCG C	pCMVdGFP-GLI3c-Mut808

Primer	Exon / nt Position in cDNA*	5'® 3' Sequenz der Primer	Matrizen
GLI3-X GLI-11 rev	Ex IX / 1245 bis 1265 Ex XI / 1624 bis 1643	CAA GCC CAC GAG TGA GTC TGC CAT TTG TGA GGC TCC TCG CC	pCMVdGFP-GLI3c-MutKEE, - MutKDE, -MutKEE+KDE
ZF-1A GLI-11 rev	Ex X / 1412 bis 1432 Ex XI / 1624 bis 1643	AAC AGG AGC CTG AAG TCA TCT CAT TTG TGA GGC TCC TCG CC	pCMVdGFP-GLI3c-Mut515
Ex 15-2 for	Ex XV / 2445 bis2464	CAA CAC CTG CAG CTT GGG TG	pCMVdGFP-GLI3dCBP
RV-3 GL-2		CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA	pPTCH1

Tab. 3a: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Überprüfung der korrekten Leseraster sind in dieser Tabelle aufgeführt. Es ist die laborinterne Bezeichnung des Primers, die Sequenz in 5'-3'- Richtung und die entsprechende Matrize des Primers angegeben. Die Vorwärtsprimer tragen den Zusatz „for“, die Rückwärtsprimer den Zusatz „rev“ in ihrem Namen. Es handelt sich entweder um Vektor-spezifische, oder *GLI3*-spezifische Primer. *Die cDNA Position (Ruppert *et al.*, 1990) ist nach den Nomenklaturempfehlungen für Humane Genmutationen angegeben, d.h. Position +1 entspricht dem A des ATG des Initiationscodons (Antonarakis *et al.*, 1998).

Die Oligonukleotide, die bei den Gelretardierungsexperimenten Verwendung fanden, sind in der Tabelle 3b aufgeführt.

Oligonukleotide	5'® 3' Sequenz der Primer	Anwendung
GLI3-BSNheI-XhoI for	CTA GTC GAC GCG GAG ACC ACC CAA GAC GAA ATT CAC AGA GLI Konsensussequenz	Herstellung eines Doppelstrangoligonukleotids mit einer 9 bp hoch affinen GLI- Bindungsstelle (spezifischer Kompetitor)
GLI3-BSNheI-XhoI rev	TCG ATC TGT GAA TTT CGT CTT GGG TGG TCT CCG CGT CGA GLI Konsensussequenz	Herstellung eines Doppelstrangoligos mit einer 9 bp hoch affinen GLI Bindungsstelle (spezifischer Kompetitor)

Oligonukleotide	5'® 3' Sequenz der Primer	Anwendung
US for	CAG CGA CTA ACA TCG ATC	Herstellung eines Doppelstrangoligos ohne spezifische Bindungsstelle (unspezifischer Kompetitor)
US rev	GCG ATC GAT GTT AGT CGC	Herstellung eines Doppelstrangoligos ohne spezifische Bindungsstelle (unspezifischer Kompetitor)

Tab. 3b: Die in dieser Arbeit für Gelretardierungsexperimente verwendeten Oligonukleotide, wurden in der oben angegebenen Tabelle aufgeführt. Nach ihrer Hybridisierung zu Doppelstrangoligonukleotiden führen sie zu einer GLI-spezifischen bzw. unspezifischen Bindungsstelle (BS). Die enthaltene GLI-Bindungssequenz ist fett gedruckt.

Die Oligonukleotide, die für eine gerichtete *in vitro* Mutagenese verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle 3c zusammengefasst.

Oligonukleotide	5'® 3' Sequenz der Primer	Ausgangs-DNA
G465R for G465R rev	C TT GTC AAG GAG GAA G <u>CGG</u> R GAC AAA GAT GAA AG C TT TCA TCT TTG TC R <u>CCG</u> GT TCC TCC TTG ACA AG	pQE9-GLI3-WT-ZF; pCMVdGFP-GLI3c; Basenaustausch von G zu C führt zum Aminosäureaustausch von Glycin (G) nach Arginin (R)
KEE/AAA for KEE/AAA rev	GCC CGA AGG AAC AAC CCT TGT C <u>K GC</u> G <u>AE GC</u> G <u>AE GC</u> A <u>A</u> AGG GGA CAA AGA TGA AAG C GCT TTC ATC TTT GTC CCC A <u>TGC</u> K A <u>CGC</u> E A <u>CGC</u> E GAC AAG GGT TGT TCC TTC GGG C	fpc 18-667; Basenaustausche von A zu G oder C führen zum Aminosäureaustausch von Lysin (K) zu Alanin (A), Glutaminsäure (E) zu Alanin (A), Glutaminsäure (E) zu Alanin (A); Mutation in pCMVdGFP-GLI3c eingeführt über Klonierung eines BstEII-BglII Fragmentes.

Oligonukleotide	5'® 3' Sequenz der Primer	Ausgangs-DNA
KDE/AAA for KDE/AAA rev	CCT TGT CAA GGA GGA AGG GGA $\frac{CGC}{K}$ _A $\frac{AGC}{D}$ _A $\frac{TGC}{E}$ _A AAG CAA ACA GGA GCC TGA AG CTT CAG GCT CCT GTT TGC $\frac{TA}{T}$ _A $\frac{AG}{CA}$ _K $\frac{AG}{DA}$ _T $\frac{C}{E}$ _{GT} CCC CTT CCT CCT TGA CAA GG	fpc 18-667; Basenaustausche von A zu G oder C führen zum Aminosäureaustausch von Lysin (K) zu Alanin (A), Asparaginsäure (D) zu Alanin (A), Glutaminsäure (E) zu Alanin (A); Mutation in pCMVdGFP-GLI3c eingeführt über Klonierung eines BstEII-BglII Fragmentes.
KEE+KDE/AAA for KEE+KDE/AAA rev	CCC TTG TCG CGG CGG CAG GGG $\frac{AC}{K}$ _G $\frac{CA}{AD}$ _G $\frac{CT}{AE}$ _G $\frac{CA}{AA}GCA AAC AGG AGC CTGCAG GCT CCT GTT TGC \frac{TA}{T}A \frac{AG}{CA}K \frac{AG}{DA}T \frac{C}{E}GT CCC CTGCCG CCG CGA CAA GGG$	pCMVdGFP-GLI3c.KEE; Basenaustausche von A zu G oder C führen zum Aminosäureaustausch von Lysin (K) zu Alanin (A), Asparaginsäure (D) zu Alanin (A), Glutaminsäure (E) zu Alanin (A)
C515G for C515G rev	GAA GGA GTT CGT $\frac{GGG}{C}$ _G CAG GTG GCT GGA C GTC CAG CCA CCT $\frac{CC}{G}$ _G $\frac{C}{C}$ _{AC} GAA CTC CTT C	pQE9-GLI3-WT-ZF; fpc 18-667; Basenaustausch von T zu G führt zum Aminosäureaustausch von Cystein (C) zu Glycin (G); Mutation in pCMVdGFP-GLI3c eingeführt über Klonierung eines BstEII-BglII Fragmentes.
C520Y for C520Y rev	GGT GGC TGG $\frac{AC}{C}$ _T $\frac{AC}{YT} CAAGAG AGCGCT CTC TTG \frac{GT}{A}Y \frac{A}{C}GT CCAGCC ACC$	pQE9-GLI3-WT-ZF; Basenaustausch von G zu A führt zum Aminosäureaustausch von Cystein (C) zu Thyrosin (Y)
R625Q for R625Q rev	CCA AGC TCC CTC $\frac{CAG}{R}$ _Q AAA CAT GTG AGG ACA GTG CAC TGT CTT CAC ATG TTT $\frac{CTG}{Q}$ _R GAG GGA GCT TGG	pQE9-GLI3-WT-ZF; Basenaustausch von G zu A führt zum Aminosäureaustausch von Arginin (R) zu Glutamin (Q)

Oligonukleotide	5'® 3' Sequenz der Primer	Ausgangs-DNA
P707S36mer for P707S36mer rev	GCC AAT GAC ATC TCA GCC AAG C _P ^{TC} T _S GG TGG TCA GTC GAC TGA CCA CC _S ^A G _P ^{GA} CTT GGC TGA GAT GTC ATT GGC	pGLI3-bs2; Basenaustausch von C zu T führt zum Aminosäureaustausch von Prolin (P) zu Serin (S); Mutation in pCMVdGFP-GLI3c eingeführt über Klonierung eines BglII-SwaI Fragmentes.
G727R for G727R rev	GCA ACT ATT CCA ACA GT _G ^A G _R ^{GG} TCG AGC TTC CTC GAG GAA GCT CGA G _R ^{CC} T _G ^{AC} TGT TGG AAT AGT TGC	pGLI3-bs2; Basenaustausch von A zu G führt zum Aminosäureaustausch von Glycin (G) zu Arginin (R); Mutation in pCMVdGFP-GLI3c eingeführt über Klonierung eines BglII-SwaI Fragmentes.
I808M for I808M rev	GGT CTC TCC TCT C _I ^{AT} G _M ^{GG} AAA TGG CAC ACA GTC GAC TGT GTG CCA TTT CC _M ^C A _T ^{AT} G AGA GGA GAG ACC	pGLI3-bs2; Basenaustausch von A zu G führt zum Aminosäureaustausch von Isoleucin (I) zu Methionin (M); Mutation in pCMVdGFP-GLI3c eingeführt über Klonierung eines BglII-SwaI Fragmentes.
Q926del for Q926del rev	GCC TCA CGC CCG CCC AG _Q ^{CAG} _{del} T ACC GCC TCA AGG CCA AG CTT GGC CTT GAG GCG GTA _{del} ^{CTG} _Q CTG GGC GGG CGT GAG GC	pGLI3-bs2; Deletion des Codons CAG führt zur Deletion der Aminosäure Glutamin (Q); Mutation in pCMVdGFP-GLI3c eingeführt über Klonierung eines BglII-SwaI Fragmentes.
S1526G29mer for S1526G29mer rev	GGC CCT GAG CCC A _S ^{GG} T _G ^{AT} CAT TCA GAA CC GGT TCT GAA TGA T _G ^{AC} C _S ^{TG} GGC TCA GGG CC	pGAL4-GLI3 ¹⁰⁴⁴⁻¹⁵⁸⁰ ; pGAL4-GLI3 ¹³⁷⁶⁻¹⁵⁸⁰ ; Basenaustausch von A zu G führt zum Aminosäureaustausch von Serin (S) zu Glycin (G);

Tab. 3c: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur *in vitro* Mutagenese, sind in der obigen Tabelle aufgeführt. Angegeben sind jeweils die Oligonukleotidprimer für die Synthese des kodierenden Stranges (for = forward) bzw. des nicht kodierenden Stranges (rev = reverse). Sie

enthalten als laborinterne Bezeichnungen die Zahlen, die die Codonnummer angeben, und die Einzelbuchstaben, die die Aminosäuresymbole darstellen. Die Basen, die eine Veränderung zur Wildtypsequenz darstellen, sind fett gedruckt und das betroffene Codon unterstrichen und hochgestellt. Der entsprechende Aminosäureaustausch ist durch die tiefgestellten Einzelbuchstaben der Aminosäuren angezeigt.

2.1.7 Verwendete Fertigsysteme

ABI Prism BigDYE Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, New Jersey/USA
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>PFU</i> Turbo® DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Ready-To-Go™ PCR beads	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lipofectin Reagent	Gibco BRL, Eggenstein
Effectene™ Transfection Reagent	QIAGEN, Hilden
ECL+Plus Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
NEN Western BLOT Chemiluminescence Reagent Plus	NEN™ Life Science, Boston/USA
Recombinant protein molecular weight marker (RPN 800)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond – P: PVDF Membrane	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
S&S Cellulosenitrat Membran (0,2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
NICK™ Column	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bio-Rad Protein Assay	BIO RAD, München
DC-Protein Assay	BIO RAD, München
Lab-Tek II Chamber Slide™ System	Nunc GmbH, Wiesbaden
Protein A Sepharose® CL-4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DAPI	Sigma, Deisenhofen

TRITC-konjugiertes Phalloidin	Freundlichst überlassen von Prof. H.P. Elsässer, Institut für Anatomie und Zellbiolo- gie, Universität Marburg.
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Heidelberg

2.1.7.1 DNA Präparations- und Aufreinigungssysteme

QIAprep Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden

2.1.7.2 Antikörper

Kaninchen-anti GLI3	EUROGENTEC, Seraing/Belgien
---------------------	--------------------------------

Immunisierung von Kaninchen mit bakteriell
exprimierten GLI3 Peptiden, spezifisch gegen

- As 158-537 (N-Terminus, Serum 710
und 711, α -NH₂-GLI3)
- As 1044-1580 (C-Terminus Domäne 6+7,
Serum 069 und 070, α -COOH-GLI3)
- As 1321-1580 (C-Terminus Domäne 7,
Serum 071 und 072, α -COOH-GLI3) des
GLI3 Proteins.

Kaninchen-anti GFP	CLONTECH, Heidelberg
Esel-anti Kaninchen, HRP gekoppelt	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ratte-anti Alpha Tubulin (Hefe)	Serotec Ltd, Oxford/England
Kaninchen-anti Ratten IgG, TRITC gekoppelt	Sigma, Deisenhofen
Esel-anti Maus, TRITC gekoppelt	Dianova, Hamburg; Freund- lichst überlassen von A. Holzbach.

Maus-anti Vimentin	Monosan Sun Bio; Freundlichst überlassen von A. Holzbach.
Maus-anti Pan-CK	Dako; Freundlichst überlassen von A. Holzbach.
Maus-anti CK18	Eigene Herstellung; Freundlichst überlassen von A. Holzbach.

2.1.8 Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
Biofuge Zentrifuge	Heraeus, Dreieich
Biometra Fast Blot B33	Biometra, Göttingen
Brutschrank Type B 5042E und T 5050	Heraeus, München
DNA Sequenzierer, Modell 373A	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA Sequenzierer, Modell 310	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA / RNA Photometer Gene Quant II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Dokumentationssystem E.A.S.Y. RH-3	Herolab, St. Leon Rot
Entwicklermaschine Konica SRX-101	Sakura, Höhenbrunn
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen
Geiger-Müller Zählrohr LB 1210B	Berthold, Wildbach
Gelelektrophoresekammern:	
horizontal	MWG Biotech, Ebersberg
vertikal	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Gelelektrophoreseschlitten	MWG Biotech, Ebersberg
Gelkämme	MWG Biotech, Ebersberg
Hamilton Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz/Schweiz
Hand-UV-Lampe 254 nm	Roth, Karlsruhe
Incubator Shaker, Model G25	New Brunswick, Edison/USA

Kieselgel-Platte 60F ₂₅₄	Merck, Darmstadt
Kühlfalle	Bachhofer, Reutlingen
Kühlzentrifuge:	
Sorvall RC-5B Refrigerated	Du Pont, Dreieich
Superspeed Centrifuge	
Luminometer Autolumat LB 953	Berthold, Wildbach
Magnetrührer Ikamag RO	Ikawerk, Staufen
pH-Meter	Wiss.-techn. Werkstätten, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme BioMax MR oder MS	Eastman Kodak, USA
Röntgenkassetten Cronex	Du Pont, Dreieich
Rotator	GFL, Burgwedel
Sterilbank Microflow Intermed (Bakterien)	Stolco, Düsseldorf
Spannungsgeber:	
EPS 500/400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EPS 600	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spannungsgeber P3000	BIORAD, München
Speedvac Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Spektralphotometer, LKB Nova spec II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Tischszintillationscounter Bench Count	Du Pont de Nemours, Dreieich
Tischzentrifugen:	
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Biofuge A	Heraeus, Hanau
Sorvall RT 6000 Kühlzentrifuge	Du Pont, Dreieich
Thermocycler:	
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, New Jersey/ USA
TRIO Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Thermostatic Circulator LKB 2219 Multitemp II	LKB Producter, Bromma/Schweden
Ultrazentrifuge OTD 65B	Du Pont, Dreieich
UV-Transilluminator UVT2016 (302nm)	Herolab, St. Leon Rot
Vakuumpumpe	Balzer, Düsseldorf

Vortex Reax control	Heidolph, Hamburg
Waagen:	
Präzisionswaage 2254	Sartorius, Göttingen
Feinwaage AE 240	Mettler, Giessen/Schweiz
Wasserbäder:	
Typ 1012	GFL, Burgwedel
Typ 1086	GFL, Burgwedel
Whatman 3M Filterpapier	Whatman Lab Sales, USA
Zellkultur-Brutschrank Cytoperm	Heraeus, Hanau
Zellkultur Lamin Air Flow HA 2448GS	Heraeus, Hanau

Alle Reaktionsgefäße, auch die in der Zellkultur verwendeten, wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Falcon (USA), Greiner (Frickenhausen), Perkin Elmer (USA), Sarstedt (Nürmbrecht) und Becton Dickinson (New Jersey/USA) bezogen. Pipettenspitzen wurden von den Firmen Sarstedt (Nürmbrecht) und Eppendorf bezogen. Nicht explizit erwähntes Zubehör zur Laborausstattung wurde von der Medizintechnik (Universität Marburg) und der Firma Kobe (Marburg) bezogen.

2.2 Standardmethoden

2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA-Lösungen weisen bei einer Wellenlänge von 260 nm eine spektralphotometrisch nachweisbare Extinktion auf, die der Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional ist ($E = \epsilon \times c \times d$; E = Extinktion, ϵ = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration und d = Schichtdicke in cm).

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm bestimmt. Die zu messende Lösung wurde dabei so verdünnt, daß man sich im linearen Meßbereich (Ext. 0,1 –2,5) befand. Die Extinktion bei 260 nm, bei einer Schichtdicke von 1 cm der Küvette, ist gleich 1 bei einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Oligonukleotide, die als Einzelstrang vorliegen, haben unter diesen Meßbedingungen eine Konzentration von 30 µg/ml.

Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt Informationen zu vorhandenen Proteinkontaminationen. Er sollte im optimalen Fall zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Die molare Konzentration von Oligonukleotiden wurde mit folgenden Formeln berechnet:

$$\text{ng} = \text{nMol} \times \text{MW}$$

$$\text{MW} = aA + gG + cC + tT - 61 \text{ (g/mol)}$$

MW = Molekulargewicht

$$A = 312,2 \text{ g/mol}$$

a, g, c, t = Anzahl der jeweiligen Base

$$G = 328,2 \text{ g/mol}$$

A, G, C, T = Molgewicht der jeweiligen Base

$$C = 288,2 \text{ g/mol}$$

(durchschnittlicher Rechenwert auch 330 g/mol)

$$T = 303,2 \text{ g/mol}$$

61 = Konstante

2.2.2 DNA-Präparation und Reinigung

2.2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA mit QIAprep Spin Kit (QIAGEN)

Für eine DNA-Präparation wurden Bakterien aus 4 ml Übernachtskultur (LB + Antibiotikum) durch Zentrifugation (3500 rpm, 10 min, 4°C, Sorvall RT 6000) in einem 14 ml Reaktionsgefäß pelletiert und dann in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Der Ansatz wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Puffer P2 versetzt, einige Male invertiert und für maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 und Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde der Ansatz für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgenommen und auf eine QIA Spin Kit Säule gegeben. Die Säule wurde zusammen mit einem Sammelgefäß für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf danach verworfen. Die an das Säulenmaterial gebundene DNA wurde mit 750 µl PE Puffer gewaschen durch Zentrifugation von 1 min bei 13.000 rpm und danach wurde die Säule eine weitere min zentrifugiert, um etwaige Flüssigkeit zu entfernen. Die DNA wurde durch Zugabe von 50 µl TE auf die Säule und Zentrifugation wie zuvor in ein Eppendorf Cup eluiert.

Die Zusammensetzung der Puffer ist dem entsprechenden Handbuch für den QIAprep Spin Plasmid Kit zu entnehmen.

2.2.2.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA (QIAGEN)

Für die Gewinnung großer DNA-Mengen mit hoher Reinheit, wurde der QIAGEN Plasmid Maxi Kit gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Bakterien aus einer 100 ml Übernachtskultur (LB+Antibiotikum) wurden durch 15 minütige Zentrifugation (6000 rpm, 4°C, Sorvall RC-5B) geerntet, in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge Centrifuge Tube, PPCO, 50 ml) überführt. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 wurde durch Invertieren gemischt und zur Lyse der Bakterien 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann wurden 10 ml vorgekühlter Puffer N3 (4°C) zugegeben, wiederum mehrfach geschwenkt und der Ansatz für 20 min auf Eis belassen. Anschließend wurde für 30 min bei 20.000 x g (Rotor SA-600, Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Säule zur DNA Präparation (QIAGEN-tip 500), die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war, gegeben. Die säulengebundene DNA wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen und schließlich mit 15 ml QF-Puffer in ein Röhrchen eluiert. Nach Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol wurde 30 min zentrifugiert (15.000 x g, 4°C, Rotor SA-600, Sorvall), die präzipitierte DNA mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 300-500 µl TE oder HPLC-a.d. gelöst.

Angaben zu den Pufferlösungen und weitere Handhabungstips sind dem entsprechenden Handbuch für QIAGEN Plasmid Maxi Kit zu entnehmen.

2.2.2.3 Phenolextraktion (Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Entfernung von Proteinen wurden DNA-Lösungen, die zuvor ein Minimalvolumen von 100 µl haben sollten (gegebenenfalls mit a.d. auffüllen), mit 1 Vol Phenol versetzt und mehrmals geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei rpm_{max} in einer Mikrozentrifuge wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit 0,5 Vol Phenol und 0,5 Vol Chloroform nachextrahiert. Die wässrige Phase wurde nochmals mit 1 Vol Sevag (24:1) versetzt, geschüttelt, zentrifugiert und anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3 Präzipitation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten (Sambrook *et al.*, 1989)

Ethanol-fällung (Ausubel *et al.*, 1994)

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Vol 3 M NaAc-Lösung (pH 7,6) und 2,5 Vol 96% Ethanol versetzt, mehrmals geschüttelt und konzentrationsabhängig 30-60 min bei -80°C gefällt. Die ausgefallene DNA wurde 30 min bei 4°C und 14.000 rpm in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurden dann zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und das Pellet an der Luft getrocknet. Je nach Verwendungszweck der DNA wurde sie in HPLC-H₂O (Sequenzierung) oder in 1x TE (für alle anderen Anwendungen) gelöst.

2.2.4 Restriktionspaltung von Plasmid-DNA

Die Behandlung der DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Angaben der Hersteller im mitgelieferten 10x Restriktionspuffer. 2-3 Units des Restriktionsenzym wurden pro µg DNA mit dem entsprechenden Puffer und bei optimaler Reaktionstemperatur eingesetzt. Die Reaktionen wurden allgemein für 1 h durchgeführt und, abhängig vom Enzym, durch Denaturierung bei 68°C für 15 min gestoppt. Der Erfolg der Restriktionsspaltung wurde durch einen entsprechenden Agarose-Gellauf überprüft.

2.2.5 Gelelektrophoresen

2.2.5.1 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Agarose wurde in Konzentrationen von 1 bis 2% in 1x TAE-Puffer suspendiert, durch Kochen im Mikrowellenherd gelöst und zur weiteren Verwendung bei 50°C aufbewahrt. Die Gellösung wurde im abgekühlten Zustand mit 0,025 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in horizontale Gelträger zum Erstarren überführt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Probenladepuffer versetzt, unterschichtent in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 90 bis 150V in 1x TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm analysiert. Die photographische Auswertung erfolgte mittels des Herolab E.A.S.Y. Systems.

2.2.5.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Oligonukleotide (siehe Tab. 3b, Abschnitt 2.1.6), die zu einem Doppelstrang hybridisiert wurden, können über ein nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden. Dazu wurde ein 12%iges natives Polyacrylamidgel hergestellt und für 1h bei 100V in 0,5x TBE einem Vorlauf unterzogen. Danach wurden die Proben, mit 1/6 Vol Gelladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen. Nach Probeneinlauf bei 200V wurden die Proben bei 7-10 V/cm für 3 h getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine fluorochrombeschichtete Kieselgelplatte gelegt und durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) die DNA-Banden sichtbar gemacht („UV-shadowing“) und ausgeschnitten.

Ladepuffer 6X	0,5 M EDTA	1600 µl
	Glycerol 99%	4 ml
	Bromphenolblau	20 mg
	Xylenzyanol	20 mg
	ad 40 ml ddH ₂ O	
Polyacrylamidgel 12%	Acrylamid-Bisacrylamid (30%; 37,5:1)	16 ml
	ddH ₂ O	3,6 ml
	1x TBE	20 ml
	APS 10%	300 µl
	TEMED	34 µl

2.2.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Gelen

2.2.6.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden nach Elektrophorese in einem präparativen Agarosegel durch kurzzeitige UV-Beleuchtung im Gel lokalisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein gesondert vorbereitetes Reaktionsgefäß

überführt und die Extraktion der DNA mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Dabei wurde die Agarose des Gelstücks 10 min bei 50°C in QG-Puffer mit pH Indikator gelöst und danach mit 1 Gelvolumen Isopropanol versetzt. Das Gemisch wurde auf eine DNA bindende Säule des Extraktionskits gegeben und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die an die Säule gebundene DNA mit 750 µl PE-Puffer durch erneute Zentrifugation gewaschen. Nachdem die Säule einmal trocken zentrifugiert wurde, konnte die gebundene DNA mit 30-50 µl TE oder EB-Puffer über einen letzten Zentrifugationsschritt eluiert werden.

Nähere Angaben zu Pufferlösungen und Durchführung sind dem entsprechenden Handbuch für QIAGEN Gel Extraction Kit zu entnehmen.

2.2.6.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelen

Die nach Gellauf auf der Kieselgel-Platte durch die Hand-UV-Lampe sichtbar gemachten DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und mit 1,5 Vol TE bei RT und 200 rpm im Schüttelinkubator zur Elution inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gelbruchstücke wurden erneut mit 100 µl TE überschichtet und für 1h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Beide Ansätze wurden vereinigt und über silikonisierte Glaswolle abzentrifugiert. Der Durchlauf mit der enthaltenen DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.7 Klonierungen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurden verschiedene Klonierungsstrategien eingesetzt. Die verwendeten Vektoren wurden nach dem Schneiden durch die Restriktionsendonukleasen mit CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Ligationen erfolgten in der Regel in einem molaren Verhältnis von 1:1 (Vektorkonzentration zu Insertkonzentration) oder mit Insertüberschuß und wurden über Nacht bei 16°C durchgeführt. Einbau und korrekte Orientierung der Inserts wurden mit Hilfe von informativen Restriktionsverdau der Plasmid-DNA überprüft. Bei allen Expressionskonstrukten ist es von entscheidender Bedeutung, daß bei einer Klonierung das Leseraster für die ent-

sprechenden Proteine beibehalten wird. Um dieses nach vollendeter Klonierung zu überprüfen, wurden alle Konstrukte dieser Art zur Kontrolle sequenziert. Die dazu verwendeten Oligonukleotide finden sich in Tab. 3a im Abschnitt 2.1.6 Oligonukleotide.

Die zur Klonierung verwendeten Vektoren sind in Tab. 1 aufgeführt. Alle Expressionskonstrukte mit der Klonierungsstrategie bzw. sonstige in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 2 zusammengestellt. Diese Tabellen sind im Kapitel 2.1.5 des Materialenteils zu finden.

2.2.7.1 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Die Rezirkulation von linearisierter Vektor-DNA kann durch Hydrolyse der Phosphatgruppen an den 5'-Enden mittels alkalischer Phosphatase verhindert werden (Sambrook *et al.*, 1989).

Die linearisierten Vektoren wurde nach der Restriktionsspaltung gleich alkalisch dephosphoryliert, indem die dem Reaktionsansatz entsprechende Menge 10x Dephosphorylierungspuffer und 1 µl CIAP (1 U/µl, Roche Diagnostics) zugesetzt wurde. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C wurde die Phosphatase für 15 min bei 68°C inaktiviert. Die dephosphorylierte DNA wurde dann über einen Gellauf gereinigt.

2.2.7.2 Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden („fill in“)

Um Enden mit 5' Überhängen aufzufüllen, wurde folgende Polymerasereaktion durchgeführt.

Die gespaltene Plasmid-DNA (5 µg in bis zu 50 µl) wurde mit 1 µl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (3U /µl) und 2 µl dNTP-Mix (20 mM) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit einer Inkubation bei 68°C für 15 min gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz über ein präparatives Gel aufgetrennt, das gewünschte DNA-Fragment eluiert und für eine Ligation eingesetzt.

2.2.7.3 Abbau von 3'-überhängenden Enden

Um bei Vektor-DNA mit 3'-überhängenden Enden diese abzubauen, wurde eine T4-DNA Polymerase Behandlung nach Restriktionsspaltung durchgeführt. Einem 50 µl Ansatz mit 5 µg Vektor-DNA wurden ca. 2,5 µg BSA, 2 µl T4-DNA-Polymerase (3

U/μl, MBI Fermentas), 1 μl NEB Puffer 4 (1x NEB Puffer 4: 50 mM K-Azetat, 20 mM Tris-Azetat, 10 mM Mg-Azetat, 1mM DTT, pH 7,9) und 1 μl dNTP-Mix (20 mM, MBI Fermentas) versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 μl 0,5 M EDTA gestoppt, die DNA durch eine Phenol-Chloroform- Aufreinigung von den Proteinen getrennt und der Weiterverarbeitung zugeführt.

2.2.7.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines Vektors mit einem Passagierfragment wird durch die DNA-Ligase katalysiert. Dieses Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch eine 3'-OH- mit einer 5'-Phosphatgruppe kovalent unter Ausbildung einer Phosphatdiesterbindung.

Für den Einbau von einem DNA-Fragment in einen Vektor wurden ein linearisierter und dephosphorylierte Vektor mit äquimolarer Menge des Inserts gemischt. Um eine möglichst hohe DNA Konzentration im Ligationsansatz zu gewährleisten, wurde das Reaktionsvolumen folgendermaßen auf 5 μl reduziert. Vektor und Insert wurden in den entsprechenden Mengen gemischt, der Gesamtansatz auf 50 μl aufgefüllt und nach bereits beschriebener Vorgehensweise präzipitiert. Das Sediment wurde dann in 3,8 μl ddH₂O aufgenommen, mit 0,5 μl Ligase-Puffer versetzt und für 10 min bei 50°C inkubiert, damit sich die DNA vollständig lösen konnte. Nach Zugabe von 0,7 μl T4-DNA-Ligase (1 U/μl) wurde der Gesamtansatz über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.8 Kompetente Zellen und Transformation

Es wurden kompetente Zellen der Stämme *E.coli* DH5α Subcloning Efficiency, *Epicurian coli*® XL-1 Blue, *E.coli* BL21(DE3)pLysS, und *E.coli* K12 SG 13009 [pREP4] verwendet. Zellen der zuerst genannten Bakterienstämme wurden erworben (siehe Kapitel 2.1.4.1 Bakterienstämme) während kompetente Bakterien vom Stamm *E. coli* K12 SG13009 [pREP4] selbst hergestellt wurden.

2.2.8.1 Herstellung kompetenter *E.coli* SG 13009 [pREP4] Bakterien

Die Herstellung von kompetenten Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan, 1983.

Von einer LB-Agarplatte wurde eine Kolonie gepickt, eine Vorkultur mit 5 ml LB-Medium angeimpft und diese über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 100 µl der Vorkultur wurden in 30 ml SOB-Medium überführt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert, wobei in regelmäßigen Abständen die Zelldichte (optische Dichte bei $\lambda=600$ nm) geprüft wurde. Bei einer Dichte zwischen 0,45 und 0,55, wenn die Zellen sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, wurde die Inkubation unterbrochen und die Kultur für 10-15 min auf Eis gestellt, um gründlich abzukühlen. Die Zellen wurden anschließend bei 2500 rpm und 4°C 12 min in der Sorvall RT 6000 Kühlzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml TFB-Puffer (1/3 Vol des Originalvolumens) aufgenommen, resuspendiert, erneut 10-15 min auf Eis inkubiert und wieder 12 min, wie oben angegeben, zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 2,4 ml TFB-Puffer resuspendiert, mit 84 µl DMSO versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 84 µl 1 M DTT und Inkubation für 10 min auf Eis, wurden erneut 84 µl DMSO zu dem Gemisch gegeben. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

TFB-Puffer	KCl	100 mM
	MnCl ₂	45 mM
	CaCl ₂	10 mM
	HACoCl ₃	3 mM
	(Hexamincobaldchlorid)	
	Mlx-MES	10 mM
	(2-N-Morpholinethonsulfon- fonsäure), pH 6,3 mit KOH einstellen	
	steril filtrieren	

2.2.8.2 Transformation von *E.coli*

Die Transformation der kommerziell zu erwerbenden kompetenten Zellen erfolgte laut Anweisung des jeweiligen Herstellers.

Die selbst hergestellten kompetenten Zellen (*E.coli* SG 13009 [pREP4]) wurden auf Eis aufgetaut und die DNA (10-50 ng) zu je 200 µl Zellen dazupipettiert, gemischt und 30

min auf Eis inkubiert. Für 45 Sekunden erfolgte dann ein Hitzeschock bei 42°C, der die Aufnahmeeffizienz steigern soll. Nach dem Abkühlen auf Eis für 1-2 min wurden zu jedem Transformationsansatz 800 µl SOC-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde dann kurz anzentrifugiert, 800 µl Überstand abgenommen, das Pellet in den verbleibenden 200 µl resuspendiert und auf LB-Agarplatten, die Ampicillin und Kanamycin enthielten, mit einem Glasspatel ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnte das Wachstum der Bakterien kontrolliert werden. Die Transformationseffizienz sollte in der Regel bei $\geq 1 \times 10^6$ CFU (colony forming unit) pro µg DNA liegen, was grundsätzlich auch erreicht wurde.

2.2.9 Kultur von *Escherichia coli*

Die Nährmedien und -böden wurden wie oben beschrieben angesetzt. Selektivmedien für Stämme, die Plasmide trugen, wurden mit dem entsprechenden Selektionsmarker versetzt (Konzentrationen siehe 2.1.3.1). *E. coli* wurde nach Inokkulation in LB-Medium über Nacht im Schüttler bei 37°C aerob kultiviert.

Bakterienstocks wurden durch Zugabe von 15-20% sterilem Glycerin hergestellt und nach sorgfältigem Mischen bei -80°C gelagert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Zellen

2.3.1.1 Auftauen

Zum Einfrieren von Zellen wurde das speziell entwickelte Einfriermedium (Cryoprotective Medium) verwendet, das 15% DMSO enthält. Da DMSO bei den aufgetauten Zellen zytotoxisch wirkt, müssen diese schnell aufgetaut und in frisches Medium überführt werden. Dabei wird die Glasampulle mit den Zellen nach Entnahme aus dem Stickstofftank gleich in ein Becherglas mit 37°C warmem Wasser überführt und nach dem Auftauen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Medienüberstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm²-Kulturflasche (mittlere), die 10 ml frisches Medium enthielt, überführt. Am folgenden Tag wurde das Me-

dium gewechselt und die Zellen bei Bedarf passagiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Inkubator, der 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit garantiert.

2.3.1.2 Passagieren

Die in Kultur befindlichen Zellen mußten je nach Proliferationsrate in regelmäßigen Abständen mit frischem Medium versorgt und ausgedünnt werden. Das Ausdünnen der Zellen variierte je nach Zelltyp von 1:2 (H441) über 1:4 (U2-OS, H661) bis zu 1:8-1:10 (COS-7, Hek 293). Hierzu wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen durch Inkubation bei 37°C in 1,5-2 ml Trypsin (Inkubationszeit stark abhängig vom Zelltyp: H441 nur ca. 30 Sekunden, U2-OS deutlich über 2 min) unter mikroskopischer Überwachung vom Flaschenboden gelöst und danach die enzymatische Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium gehemmt. Je nach Höhe des Ausdünnungsfaktors wurde ein Teil der Zellen in die neuen Kulturflaschen, gefüllt mit 10 ml Medium, überführt.

2.3.1.3 Einfrieren und Lagerung

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie beim Passagieren vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und dann 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zu gleichen Teilen in normalem Zellkultur- (0,75 ml) und Einfriermedium (0,75 ml) resuspendiert. Da selbst hergestelltes Einfriermedium in der Regel eine höhere Zytotoxizität besitzt, wurde ein Fertigprodukt (Cryoprotective Medium) verwendet. Um spätere Schäden durch Kristallbildung zu vermeiden, war darauf zu achten, daß das resuspendierte Zellpellet gleich in einer Glasampulle eingeschweißt wurde und der Einfrierprozeß unmittelbar, aber langsam vor sich ging. Dazu wurden die Ampullen gut gemischt in einen Einfrierständer in die Gasphase des flüssigen Stickstoff gehängt und am nächsten Tag in den Stickstoff versenkt. Auf diese Art und Weise sind die Zellen dauerhaft lagerbar.

Zur kurzfristigen Lagerung bis zu 2-3 Monaten wurden -80°C Gefriertruhen verwendet.

2.3.2 Transiente Transfektion

Transiente Transfektion ist eine generelle Bezeichnung für das Verfahren zur vorübergehenden Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen.

2.3.2.1 Liposomen-vermittelte Transfektion

Ein Verfahren zur transienten Transfektion von Zellen ist die Verwendung von Liposomen. Durch Vorinkubation von DNA mit den Liposomen des „Lipofectin Reagent“ (Gibco BRL), bilden sich DNA-Liposomen-Komplexe, die sich bei der Transfektion an die Zellmembran anlagern und wahrscheinlich über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Diese Transfektionsmethode ist für ein breites Spektrum von Zellen anwendbar, aber sollte in Bezug auf die Zelllinie, die Anzahl der einzusetzenden Zellen und das Verhältnis von DNA-Menge zur Lipofectin-Menge optimiert werden. Für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien waren die Bedingungen in unserer Arbeitsgruppe schon optimiert worden (Jacobsen, 1996; Topp, 1997).

Zur Transfektion sollte die Konfluenz der Zellen maximal 60% betragen. Dazu wurden am Vortag $2,5 \times 10^5$ Zellen (NCI-H441 und U2-OS) in 6-Loch-Platten für den Luciferase-Assay ausgesät und in 2 ml Medium kultiviert. Am Tag der Transfektion wurden in Polystyrenröhrchen 5 μ l Lipofectin-Reagenz und 100 μ l serumreduziertes Medium (Opti-MEM) gemischt und 30-45 min bei RT inkubiert. Die DNAs wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, wo bereits 100 μ l Opti-MEM vorgelegt war. Beim Einsatz verschiedener DNA Konzentrationen der zu untersuchenden Expressionskonstrukte, wurde die zu transfizierende Gesamt-DNA Menge mit Leervektoren entsprechend des Promotors (CMV) der Expressionskonstrukte und entsprechend der noch fehlenden Plasmid-DNA Menge auf 1 μ g aufgefüllt. Die Konzentration der transfizierten Reportergene betrug 1 μ g für pG5E1bLuc und 1,5 μ g für 8X3'GLI-BS Luc bzw. 8X3'MutGLI-BS Luc. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden 20 ng des internen Reporters pRL-TK eingesetzt. Das Gemisch aus DNAs und serumreduziertem Medium wurde zum Ansatz mit enthaltenem Lipofectin pipettiert, gemischt und erneut 15 min bei RT inkubiert, während dessen sich die DNA-Liposomen-Komplexe bilden können. Dieser Gesamtansatz wurde dann mit 800 μ l Opti-MEM versetzt und tropfenweise auf die mit PBS und serumreduziertem Medium gewaschenen Zellen gegeben und inkubiert. Die Aufnahme der DNA findet in den ersten Stunden nach Transfektion statt, so daß zum

Schutz der Zellen gegen den Streß des serumfreien Mediums und der Toxizität des Transfektionsreagenzes das Transfektionsgemisch 5-6 h später gegen normales Zellkulturmedium ausgetauscht wurde. 24 bzw. 48 h nach Transfektion konnte die Reportergenaktivität detektiert werden.

2.3.2.2 „Effectene“-vermittelte Transfektion

Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen und den Verbrauch der DNA Mengen zu verringern, wurde das neu entwickelte Transfektionsreagenz zur transienten Transfektion, Effectene™ Transfection Reagent (QIAGEN), eingesetzt. Da es zusammen mit serumhaltigem Medium angewendet werden kann, verringert sich die Zytotoxizität.

Das Prinzip dieses Reagenz` beruht auf der Kondensation der zu transfizierenden DNA mit Hilfe eines Verstärkers (Enhancers) unter definierten Pufferbedingungen (EC-Puffer). Das zugefügte Effectene Reagenz assoziiert sich mit der kondensierten DNA und formt auf diese Weise spontan Mizellen gleicher Größe und Struktur. Die Kondensation und Abdeckung der DNA in dem Effectene-DNA-Komplex, der direkt mit dem Zellkulturmedium gemischt werden kann, führt zu einer hohen und reproduzierbaren Transfektionseffizienz.

Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen zu 40-80% konfluent sein. Dazu wurden am Vortag $1-2 \times 10^5$ Zellen (U2-OS, COS-7, NCI-H661) in je eine Kammer der Lab-Tek II Chamber slides für Lokalisationsstudien und Immunhistologie, bzw. 1×10^6 Zellen (U2-OS, Hek 293, NCI-H661) in einer 75 cm^2 Kulturflasche für Zellextrakte ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde die DNA (0,25-0,5 μg für Lab-Tek II Kammern und 2-3 μg für mittlere Kulturflaschen) mit EC-Puffer und Enhancer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und 2-5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der entsprechenden Menge Effectene, es wurde erneut gemischt und 5-10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe einer definierten Menge Zellkulturmedium wurden die Ansätze tropfenweise auf die mit PBS gewaschenen und frischem Medium versetzten Zellen pipettiert und dann inkubiert. Es war kein Mediumwechsel nach Ablauf der eigentlichen DNA-Aufnahme durch die Zellen erforderlich. Zellextraktpräparation bzw. Immunhistochemie erfolgte 24-48 h nach der Transfektion. Die bei diesem Transfektionssystem eingesetzten Mengen sind in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgeführt.

Kulturformat	DNA (µg)	EC-Puffer (µl)	Enhancer (µl)	Effectene (µl)	Mediumvolumen auf die Zellen (µl)	Mediumvolumen zum Reaktionsansatz (µl)
Lab-Tek II	0,25-0,5	80	2	4	1600	400
75 cm ² Flasche (fpc 18-1549)	3	500	14	16	7000	3000
75 cm ² Flasche (fpc 18-1100 und fpc 18-828)	2	400	12	15	7000	3000
75 cm ² Flasche (fpc 18-667)	1,5	300	8	10	7000	3000
75 cm ² Flasche (fpc 18-396)	1,2	300	8	10	7000	3000

Tab. 4: Transfektionsbedingungen beim Effectene System. EC-Puffer, Enhancer und Effectene sind Bestandteile des verwendeten Transfektionssystems. Angaben zur Zusammensetzung sind dem Handbuch von QIAGEN (Effectene™ Transfection Reagent Handbook) zu entnehmen.

2.3.3 Gewinnung von Zellextrakten

2.3.3.1 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Die gesamten Proteine aus einer Zelllinie gewinnt man durch mechanischen Aufschluß der Zellen bei gleichzeitiger Hemmung der Proteolyse. Diese Methode wurde angewandt, um endogenes als auch nach transienter Transfektion vorhandenes GLI3 Protein zu gewinnen. Die Zellen wurden dabei einmal mit PBS bei RT gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden im Kühlraum mit vorgekühltem Puffer durchgeführt. Zellen von mittleren Kulturflaschen wurden mit Hilfe eines Zellschabers in 500 µl RIPA Puffer, versetzt mit einem Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, gerntet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch mechanisches Scheren mit einer 21-Gauge Kanüle wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Flaschen wurden erneut mit 500 µl RIPA Puffer gespült und diese Zellsuspension mit der ersten Fraktion vereint und erneut geschert. Die Suspension wurde 60 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min mit 15.000x g bei 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand war das Gesamtzellysat und wurde, als 50 und

100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

RIPA Puffer (nach Santa Cruz Biotechnology)	PBS	1X
	NP-40	1%
	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (w/v) (Natriumdesoxycholat)	0,5%
	SDS; 10% (w/v)	0,1%
	in 10 ml Puffer eine Proteasen- Inhibitoren-Cocktail Complete™, Mini Tablette lösen	
Complete™, Mini	Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Roche, Mannheim)	
RIPA Puffer nach Beachy (2000)	Tris, pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X 100 (v/v)	1%
	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (w/v) (Natriumdesoxycholat)	1%
	SDS; 10% (w/v)	0,1%
	in 10 ml Puffer eine Proteasen- Inhibitoren-Cocktail Complete™, Mini Tablette lösen	

2.3.3.2 Gewinnung von Kernextrakten

Die Mikropräparation von Kernextrakten wurde nach der Methode von Andrews und Faller (1991) durchgeführt. Diese Technik basiert auf dem Schwellen der Zellen in einem hypotonischen Puffer gefolgt von einer Salzextraktion der Proteine aus dem Zellkern. Kernextrakte von *GLI3* mRNA exprimierenden und transient transfizierten Zellen wurden in Gelretardierungsexperimenten sowie in Western Blots eingesetzt.

Die verwendeten Zellen wurden einmal mit PBS bei RT gewaschen, danach wurden alle weiteren Schritte im Kühlraum mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Die in kaltem

PBS mit Zellschaber geernteten Zellen wurden durch eine 10 Sekunden Zentrifugation bei rpm_{max} in einer Tischzentrifuge (13.000 rpm) pelletiert und das Pellet in 400-600 μl Puffer A aufgenommen und resuspendiert. Durch Inkubation auf Eis für 10 min quollen die Zellen, so daß sie durch anschließendes vortexen für 10 Sekunden zum Platzen gebracht werden konnten. Die Zellkerne wurden durch eine erneute Zentrifugation für 10 Sekunden mit 13.000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 60-80 μl Puffer C, Resuspension des Pellets und erneuter Inkubation für 20 min auf Eis wurden die Kernproteine ausgesalzen. Durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm konnten die löslichen Kernproteine im Überstand von den Zellresten getrennt werden. Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Aliquots lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -80°C .

Puffer A (hypotonisch)	HEPES, pH 7,9 mit KOH	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	KCl	10 mM
	DTT	0,5 mM
	PMSF	0,2 mM

Puffer C (hypertonisch)	HEPES, pH 7,9 mit KOH	20 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	NaCl	420 mM
	EDTA	0,2 mM
	Glycerin (v/v)	25%
	DTT	0,5 mM
	PMSF	0,2 mM

DTT (Dithiothreitol; Sigma) 1,54 g in 10 ml 0,01 M NaOAc pH 5,2 lösen, steril filtrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern; erst kurz vor Gebrauch zugeben

PMSF (Phenylmethansulfonylfluoride; Sigma)	0,1 M Stocklösung (17,4 mg/ml) in Isopropanol lösen; erst kurz vor Gebrauch zugeben
--	---

2.3.4 Messung der Aktivität von Reportergenen

Zur Untersuchung der Aktivierungs- und Repressionsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren verbindet man sogenannte Reportergene mit artifiziellen oder natürlichen Bindungsstellen des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors. Ist das Transkriptionsfaktorprotein in der Lage, die spezifische Bindungssequenz zu erkennen und mit ihr zu interagieren, wird die Transkriptionsrate des Reportergens beeinflusst. Reportergene kodieren für Enzyme, deren Aktivität man leicht messen kann. Die Enzymaktivität, die von der gebildeten Enzymmenge abhängt, läßt auf die Wirkung des zu untersuchenden Proteins schließen.

2.3.4.1 Dual-Luciferase Reporter Assay

Dieser Methode liegt die Verwendung zweier Luciferase-Enzyme, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden, zugrunde. Sie ermöglicht die Analyse der experimentell eingesetzten und der Kontroll-DNA im gleichen Ansatz. Der „experimentelle“ Reporter reflektiert den Effekt der spezifischen experimentellen Bedingungen, während der kotransfizierte „Kontroll“-Reporter eine interne Kontrolle der Transfektionseffizienz darstellt. Bei der Kotransfektion von Plasmiden mit sehr starken Promotorelementen, die ganz oder teilweise über gleiche Faktoren wirken, kann es zu Störungen der Reporterexpressionen kommen. Um diese „trans“-Effekte zu vermeiden, setzt man den „Kontroll“-Reporter in wesentlich geringerer Konzentration (1/50 bis 1/100) wie den „experimentellen“ Reporter ein und verwendet gleichzeitig ein Kontrollkonstrukt mit schwachem Promotor. Der in dieser Arbeit verwendete „Kontroll“-Reporter enthielt die Thymidinkinase Promotor Region des *Herpes simplex* Virus.

Die Luciferase der Firefly (*Photinus pyralis*, experimenteller Reporter) und die der *Renilla reniformis* (Kontroll-Reporter) sind unterschiedlichen evolutionären Ursprungs und haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Enzymstrukturen auch unterschiedliche Substrate. Das Luciferin-Enzym katalysiert eine ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Freisetzung von Lichtenergie einer Wellenlänge von 562

nm. Die Lumineszenz-Reaktion, die durch *Renilla*-Luciferase katalysiert wird, findet durch oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin unter Freisetzung von Lichtenergie statt. Diese entsprechenden Biolumineszenz-Reaktionen lassen sich unterscheiden, wenn man nach Messung der Firefly-Luciferase Aktivität diese hemmt und durch gleichzeitige *Renilla*-Substratzugabe erneut Licht durch die *Renilla*-Luciferase Aktivität freigesetzt wird.

Die in diesem Assay getesteten Zellen wurden transient transfiziert (siehe Abschnitt 2.3.2.1) und nach einer Inkubation von 24-48 h geerntet. Die zweimal mit PBS gewaschenen Zellen wurden mit 500 µl passivem Lysispuffer 10 min bei RT auf einem Rotator lysiert. Die Zellen lösten sich durch den Puffer von den Kulturschalen ab, so daß die Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden konnte. Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation von 30 Sekunden bei 14.000 rpm abgetrennt und der Überstand in frische Gefäße überführt und kurzfristig bei 4°C gelagert. Die für die Messungen nötigen Substrate wurden frisch, nach Angaben des Herstellers angesetzt, und bei Raumtemperatur verwendet. Von dem klaren Lysisüberstand wurden je 20 µl in die Meßröhrchen (Polystyrol, Ø 12 mm, 75 mm Höhe, Sarstedt) überführt, welche bis zum Einsetzen in das Luminometer auf Eis gelagert wurden. Die für die Messung erforderlichen Einstellungen am Gerät waren bereits vorhanden (z.B. Einstellung der Meßzeit, des Meßzeitintervalls, des Volumens der Injektorpumpe), so daß vor Beginn der Messungen nur das Injektorsystem mit ddH₂O in 6 Waschzyklen gespült werden mußte. Vor Messung der ersten Probe wurde das Substrat in 8 Waschröhrchen injiziert, um das Wasser aus dem Pipettiersystem zu entfernen, dann erfolgte die erste Probenmessung. Die Chemilumineszenz wurde durch automatische Injektion von 100 µl Substrat pro Probe gemessen und der Meßwert in RLUs (Relative Light Units) angegeben. Nulleffektmessungen erwiesen sich nach den ersten Versuchen als so gering, daß sie bei der späteren Auswertung vernachlässigt werden konnten. Nach der Messung der Firefly-Luciferase wurde das Injektorsystem wieder mit 6 Waschzyklen ddH₂O gespült. Das zweite injizierte Reagenz „Stop and Glo“ enthält neben dem Substrat Coelenterazin auch noch eine Hemmsubstanz für die Firefly-Chemilumineszenz der ersten Messung. Die Proben wurden wieder mit den 8 Waschröhrchen voran in Meßposition gebracht, so daß die *Renilla*-Luciferase Messung in den gleichen Röhrchen erfolgen konnte. Das „Stop and Glo“ Reagenz ist in nicht behandelten Kunststoffgefäßen instabil und wurde daher in siliconisierten Polypropylen- oder Glasgefäßen angesetzt werden.

Da es von entscheidender Bedeutung ist, das „Stop and Glo“ Reagenz wieder vollständig aus dem System zu entfernen, mußte eine besondere Reinigung durchgeführt werden, denn schon geringste Reste des Reagenz` hemmen die Luciferase-Aktivitätsmessung der nachfolgenden Experimente. Nach 6 Waschzyklen mit ddH₂O wurde der Injektor mit einer frisch angesetzten Lösung aus 1,8 ml Methanol und 1,8 ml 1,05% Natriumhypochlorid gereinigt. Diese Lösung wurde über Nacht im Injektionssystem belassen und am folgenden Tag durch 6 Waschzyklen mit ddH₂O entfernt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Proteine eines Proteingemisches können in einer diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Die Proteingele bestehen aus zwei Teilen, dem oberen Sammelgel, das etwa ein Drittel der Gelgröße einnimmt, und dem unteren Trenngel. Die Ionenverhältnisse der beiden Teile unterscheiden sich so, daß die Proteine im Sammelgel konzentriert werden und dann alle gleichzeitig in das höher vernetzte Trenngel eintreten können. Damit zwischen Sammel- und Trenngel eine scharfe Trennlinie entsteht, wurde das Trenngel nach dem Gießen mit n-Butanol überschichtet. Nach Abschluß der Polymerisation wurde die Überschichtung entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesteckt. Je nach Anwendungszweck können verschiedene Vernetzungsgrade, Dicken und Größen der Gele gewählt werden.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in Gegenwart von SDS (Natriumlaurylsulfat) elektrophoretisch aufgetrennt. Das SDS denaturiert die Proteine vollständig und lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an sie an, so daß deren Eigenladungen überlagert werden. Die Proteine bewegen sich daher in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode. In einem definierten Größenbereich der Proteine, abhängig von den Gelbedingungen, ist die Laufstrecke eines Proteins umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichtes und kann über den Vergleich der Molekulargewichte bekannter Proteine bestimmt werden (Laemmli, 1970).

Die analytische Auftrennung der in *E. coli* exprimierten eukaryontischen Proteine bzw. eukaryotische Proteinextrakte fand mit Trenngelen von 12%, 6% oder 5% Polyacrylamid statt, die mit 5%igen oder 4%igen Sammelgelen überschichtet waren. Die Aliquots der bakteriellen Proteininduktion wurden über ihre OD quantifiziert, mit der entsprechenden Menge 2x Probenpuffer versetzt und je 10 µl (entspricht einer OD von 0,25) auf Minigele (Schichtdicke 0,75 mm) aufgetragen. Die nach Bradford (siehe 2.4.3) quantifizierten Proteine der eukaryontischen Zellextrakte wurden mit 3x Probenpuffer versetzt aufgekocht und eine Menge von 100-150 µg auf Gele mit einer Schichtdicke von 1,5 mm aufgetragen. Durch das Aufkochen werden die Proteine denaturiert, die Disulfidbrücken durch Reduktion mit β -Mercaptoethanol gespalten und von einer SDS-Mizelle umhüllt. Der Einlauf der Proteine ins Sammelgel fand bei 20 mA und max. 150 V statt, die elektrophoretische Auftrennung wurde mit 40 mA und max. 150 V durchgeführt. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine wurde je eine Spur mit „Mark12™ Wide Range Protein Standard“ (Novex) oder mit „Rainbow Recombinant protein molecular weight marker“ (Amersham) beladen. Anschließend wurden die Proteine entweder Coomassie-Blau gefärbt, oder auf Nitrozellulose transferiert.

Polyacrylamid-Trenngel 12%

40%	Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	15 ml
	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	12,5 ml
	10% SDS (w/v)	0,5 ml
	ad 49,5 ml ddH ₂ O	

Für diese und die folgenden Gele wurde die Polymerisation vor dem Gießen durch Zugabe der folgenden Komponenten gestartet:

10% APS (w/v)	10 µl/ml Gel
TEMED	0,4 µl/ml Gel

Polyacrylamid-Trenngel 6% / 5%	Acrylamid:Bisacryl- amid (40%, 29:1)	1,5 ml/1,25 ml
	Tris-HCl; 1,5 M, pH8,8	2,5 ml
	SDS; 10% (w/v)	0,1 ml
	ddH ₂ O	5,9 ml/6,15 ml
	APS; 10% (w/v)	10 µl/ml Gel
	TEMED	0,8 µl/ml Gel
Polyacrylamid-Sammelgel 5%	Acrylamid:Bisacrylamid (40%; 29:1)	2,5 ml
	Tris-HCl; 1 M, pH 6,8	2,5 ml
	SDS; 10% (w/v)	0,2 ml
	ad 19,7 ml ddH ₂ O	
	APS; 10% (w/v)	10 µl/ml Gel
	TEMED	1 µl/ml Gel
Polyacrylamid-Sammelgel 4%	Acrylamid:Bisacrylamid (40%; 29:1)	0,5 ml
	Tris-HCl; 1 M, pH 6,8	0,625 ml
	SDS; 10% (w/v)	0,05 ml
	ddH ₂ O	3,6 ml
	APS; 10% (w/v)	10 µl/ml Gel
	TEMED	1 µl/ml Gel
3x SDS-Probenpuffer	Bromphenolblau	0,02%
	SDS	4%
	Glycerin	20 %
	Tris-HCl, pH 6,8	100 mM
	β-Mercaptoethanol	7,5%
5X PAGE-Puffer	Tris	0,125 M
	Glyzin	1,25 M
	pH 8,3 einstellen	
	SDS	0,5% (w/v)

2.4.2 Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit Coomassie-Blau

Nach der Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel 1 h bei RT unter Schwenken in einem 1:1 Gemisch der Färbelösungen 1 und 2 gefärbt. Anschließend wurde das Gel bei RT so lange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Dieser Vorgang dauerte mehrere Stunden, wobei die Entfärbelösung ein- bis zweimal gewechselt wurde. Danach konnte das Gel über Nacht in einem Geltrocknungsrahmen (Roth) zwischen Zellophanfolie (Larve Cellophane, Novex) getrocknet werden.

Färbelösung 1	Serva Blau R in 96% Ethanol gelöst	2 g/l
Färbelösung 2	Eisessig (100%) auf 1 l H ₂ O	200 ml
Entfärbelösung	Ethanol 96% Eisessig (100%) auf 1 l H ₂ O	300 ml 100 ml
Aufbewahrungslösung	Eisessig (100%) Ethanol 96% Glyzerin ad 1 l mit H ₂ O auffüllen	75 ml 50 ml 20 ml

2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford und Lowry

Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 wird durch Bindung an Proteine in saurer Lösung von 465 auf 595 nm verschoben (Bradford). Bei dieser Methode wurde eine Probe der Proteine (1-5 µl) mit Wasser auf 800 µl verdünnt, mit 1/5 Volumen (200 µl) Farbstoffkonzentrat versetzt und 5-10 min inkubiert (Bio-Rad Protein Assay). Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde die Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 595$ nm vorgenommen. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden mehrere

Konzentrationen von BSA zwischen 1 µg/ml und 10 µg/ml gemessen. Ein Vergleich der Absorption der Proben mit der Eichkurve ergab die Probenkonzentration.

Da Puffer C der Kernextraktpräparation eine Konzentration an Detergenzien enthält, die mit der Proteinmessung nach Bradford interferieren, wurde für diese Proben die Proteinmessung nach Lowry durchgeführt (Bio-Rad DC Protein Assay). Es handelt sich dabei ebenfalls um eine colorimetrische Methode, die bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750$ nm ausgewertet wird. 1-5 µl einer Proteinprobe wurden auf ein Gesamtvolumen von 200 µl mit a.d. verdünnt, 100 µl Reagenz A` und 800 µl Reagenz B zugegeben, 15 min inkubiert und dann gemessen. Die Auswertung erfolgte wie bei der Bradford-Methode über eine Eichgerade.

2.4.4 Expression eukaryotischer Gene in *E.coli*

In dieser Arbeit wurden rekombinante GLI3 Peptide unterschiedlicher Regionen (N-Terminus und C-Terminus für die Immunisierung, GLI3-Zinkfinger Peptide für Gelretardierungsassays) exprimiert. Als Expressionsvektoren wurden dabei pQE-9 (QIAGEN), das pRSET-System (Invitrogen) und das pET-System (Invitrogen) verwendet.

Bei pET und pRSET wird die Expression eukaryotischer Gene in *E.coli* mit Hilfe des T7-RNA-Polymerase/Promotor-Systems (Studier und Moffat, 1986; Studier et al., 1990) durchgeführt. Dieses System bietet gegenüber bakteriellen Promotoren folgende Vorteile. Auf der einen Seite initiiert die T7 RNA Polymerase hoch selektiv nur am Bakteriophagen T7 ϕ 10-Promotor. Auf der anderen Seite besitzt die T7 RNA Polymerase eine Transkriptionseffizienz, die die der bakteriellen Polymerasen um ein Vielfaches übertrifft. Die genetische Information zur Synthese der T7 RNA Polymerase ist stabil in das Genom des verwendeten Bakterienstamms (*E.coli* BL21(DE3)pLysS) integriert. Dieser Stamm enthält ein Bakteriophagen λ DE3 Lysogen und eine Kopie des T7 RNA Polymerasegens unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors, wodurch die Expression der T7 RNA Polymerase und somit des eukaryotischen Gens durch IPTG induziert werden kann. Um auch potentiell toxische Proteine zu exprimieren, wird die basale Aktivität der T7 RNA Polymerase durch Bindung an das T7-Lysozym inhibiert (Moffatt und Studier, 1987). Das T7 Lysozymgen sowie eine Chloramphenicolresistenz sind auf einem Plasmid kodiert.

BL21 (DE3)pLysS wurde mit pET- und pRSET-Translationsvektoren transformiert (2.2.8.2). Mit etwa 10 frischen Klonen wurden jeweils 10 ml LB-Medium mit 50 µg/ml

Ampicillin und 25 µg/ml Chloramphenicol beimpft und bei 37°C geschüttelt, bis zur leichten Eintrübung der Kultur. Je 5 ml wurde zum Animpfen von 500 ml LB-Medium eingesetzt. Diese Kultur wurde bei 250 rpm und 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,45-0,6$ geschüttelt. Für die Induktion wurde das Medium auf 0,4 mM IPTG eingestellt und die Inkubation 2-3 h fortgesetzt. Während der Expressionsphase wurde jede Stunde ein Aliquot entnommen, um die Proteininduktion mit einer SDS-PAGE überprüfen zu können. Nach 3 h die Zellen 20 min bei 4°C und 3500 rpm in einer Sorvall Kühlzentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 0,25 Kulturvolumen kaltem 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation, wie oben bereits angegeben, wurde der Waschüberstand verworfen und die Zellen als Pellet bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.5 Isolierung und Reinigung von Einschlußkörperchen nach Nagai *et al.*, 1985

Die durch die Expressionsvektoren pET und pRSET in *E.coli* exprimierten rekombinanten Proteine wurden in Einschlußkörperchen abgelagert und nach einer abgewandelten Methode von Nagai *et al.*, 1985 isoliert. Dabei wurden die nach Induktion abzentrifugierten Bakterien einer 500 ml Kultur in 20 ml Resuspensionspuffer aufgenommen, eine Spatelspitze Lysozym zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die freigewordene genomische DNA erhöht die Viskosität der Lösung und wurde durch Zugabe von 500 µg DNaseI in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$ und 1 mM $MnCl_2$ 30 bis 60 min bei RT verdaut. Der Bakterienextrakt wurde anschließend mehrmals in flüssigem Stickstoffschockgefroren und wieder aufgetaut, um dann in einer Sorvall Tischzentrifuge für 30 min bei 3500 rpm zentrifugiert zu werden. Vom Überstand wurde ein Aliquot abgenommen, um zu testen, ob die exprimierten Proteine eventuell löslich sind und sich in der flüssigen Phase befinden. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde mindestens fünfmal mit Waschlösung 1 und ungefähr zehn- bis zwanzigmal mit Waschlösung 2 gewaschen. Die in diesen Lösungen enthaltenen Detergenzien lösten die Membranbestandteile des Pellets, so daß am Ende die gereinigten Einschlußkörperchen übrig blieben. Auch von den Überständen einiger Waschschriffe wurden Proben für eine Proteingel-Analyse entnommen. Nach dem letzten Waschschriff mit Lösung 2 wurden die Einschlußkörperchen einmal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bei –20°C eingefroren. Die Proteine aus den zu analysierenden Überständen sowie eine Probe der

gereinigten Einschlußkörperchen wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem Proteingel aufgetrennt.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der in PBS vorliegenden Einschlußkörperchen wurden 5-10 µl der gut gemischten Suspension abgenommen, mit 5-10 µl 6 M Guanidinhydrochlorid versetzt und die Konzentration der nun gelösten Proteine nach Bradford bestimmt. Die so aufgereinigten Einschlußkörperchen konnten ohne weitere Behandlung zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden.

Resuspensionspuffer	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
	Saccharose (w/v)	25%
	EDTA, pH 8,0	1 mM
Waschlösung 1	NaCl	200 mM
	C ₂₄ H ₃₉ O ₄ Na·H ₂ O (w/v)	1%
	(Natriumdesoxycholat)	
	NP-40 (v/v)	1,6%
	Tris-HCl, pH 7,5	20 mM
	EDTA, pH 8,0	2 mM
Waschlösung 2	Triton X 100 (v/v)	0,5%
	EDTA, pH 8,0	1 mM

2.4.6 Isolierung und Reinigung von Einschlußkörperchen nach Kadonaga *et al.*, 1987

Die nach Beendigung der Induktion präzipitierten Zellen wurden in 1 ml Puffer A resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl Lysozymbilösung (1mg/ml Puffer A) wurde die Suspension 1 h bei 4°C inkubiert. Einschlußkörperchen wurden durch Mischen mit 1 ml Denaturierungspuffer für eine Stunde bei 4°C in Lösung gebracht. Nach einer Ultrazentrifugation in der Ultrazentrifuge Sorvall OTD65B mit dem TST 60.4 Rotor (Du Pont) bei 4°C und 38.000 rpm für 1 h, wurde der Überstand gegen 0,5 l 1 M Harnstoff in Puffer B 90 min bei 4°C dialysiert. Die Dialyse wurde über Nacht in 1,5 l Puffer B fortgesetzt. Die Extrakte wurden 5 min bei 4°C und 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge Eppendorf 5417 C zentrifugiert und der Überstand in Aliquots bei -80°C gelagert.

Puffer A	Tris-HCl, pH 7,7	40 mM
	Saccharose (w/v)	25%
	EDTA	0,2 mM
	Na ₂ S ₂ O ₅ (Sodiumdisulfit)	1 mM
	DTT	1 mM
	PMSF	1 mM
Denaturierungspuffer	CH ₄ N ₂ O (Harnstoff) in Puffer A gelöst	10 M
Puffer B	Tris-HCl, pH 7,7	20 mM
	KCl	50 mM
	MgCl ₂	10 mM
	EDTA	1 mM
	ZnSO ₄	10 µM
	Glyzerin (v/v)	20%
	Na ₂ S ₂ O ₅ (Sodiumdisulfit)	1 mM
	DTT	1 mM
PMSF	0,2 mM	

PMSF Stocklösung 0,2 M, (frisch in Isopropanol gelöst)

Dialyseschlauch, Spectra / Por® Membrane, MWCO: 10.000 (Roth)

2.4.7 Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot, „Semidry-Verfahren“, Teil 1)

Die in einer SDS-PAGE (2.4.1) aufgetrennten Proteine wurden über Elektroblob in einer Horizontalkammer auf Nitrozellulose transferiert.

Nach Beendigung des Gellaufes, d.h. wenn der Blaumarker des Probenpuffers gerade aus dem Gel gelaufen war, wurde das Sammelgel mit einem Skalpell vom Trenngel getrennt und das Trenngel nach Markierung der Gelorientierung für 45 min in vorgekühltem (4°C) Transferpuffer äquilibriert. Whatman 3MM-Papier und eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll) wurden exakt auf Größe des inkubierenden Trenn-

gels zugeschnitten und ebenfalls im Transferpuffer inkubiert. Der Proteintransfer wurde mit einer Elektrophoreseapparatur Biometra Fast Blot B33 durchgeführt und wie folgt vorbereitet: Auf die untere Anodenplatte wurden 5 Schichten in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere aufgelegt und luftblasenfrei mit der Nitrozellulosemembran, dem Polyacrylamidgel und 5 weiteren lagen Whatman-Papier überschichtet. Nach Auflegen der oberen Kathodenplatte wurde das Gel für 90-120 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membranfläche geblottet. Der erfolgreiche und vollständige Transfer der Proteine wurde über die Anwesenheit der farbigen Banden des Rainbowmarkers auf der Membran, oder einer anschließenden Coomassie-Färbung des geblotteten Gels überprüft. Nach Beendigung des Transfers und Spülen der Membran in ddH₂O, konnte sie gleich weiter verwendet werden, oder luftgetrocknet, zwischen Whatman-Papier im Kühlschrank bis zur Verwendung (max. 3 Monate) aufgehoben werden.

Transferpuffer	Glyzin	39 mM
	Tris	48 mM
	SDS (w/v)	0,04%
	Methanol (v/v)	20%

2.4.8 Gelretardierungsexperimente

Die Bindung von bakteriell exprimierten Proteinen an DNA Sequenzen wurde durch Elektrophorese von Protein-DNA-Komplexen untersucht. Für diesen Zweck wurden radioaktiv endmarkierte Oligonukleotide in Anwesenheit von unspezifischer Kompetitor-DNA mit Extrakt inkubiert und die Inkubationsprodukte anschließend auf nativen Polyacrylamidgelen niedriger Ionenstärke aufgetrennt (Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1981). Von Proteinen gebundene DNA wandert langsamer im Gel als die freie DNA und erscheint als eine Bande, deren Wanderungsgeschwindigkeit durch die Größe, Ladung und Struktur des DNA-Protein Komplexes bestimmt wird. Die Bindungsspezifität wird durch Kompetition der Komplexbildung mit einem Überschuß an nicht markiertem Oligonukleotid, oder unspezifischen DNA-Fragmenten als Vergleich, überprüft.

2.4.8.1 Hybridisierung und Markierung der Oligonukleotide

Oligonukleotide mit spezifischer GLI-Konsensus- oder einer unspezifischen Sequenz (siehe Tab. 3b, Abschnitt 2.1.6) wurden zu Doppelsträngen hybridisiert. Dabei wurden je 50 µg forward (for) und reverse (rev) Oligonukleotid mit NaCl in einer Endkonzentration von 33 mM und einem Volumen von 30 µl (mit TE aufgefüllt) 5 min auf 90°C in einem Wasserbad erhitzt. Dieser Ansatz sollte dann langsam über einen Zeitraum von ca. 2 h bis auf 4°C abkühlen, wobei die komplementären DNA-Stränge zu einem Doppelstrang hybridisieren. Diese Proben wurden dann, wie in 2.2.5.2 und 2.2.6.2 beschrieben, aufgetrennt und aufgereinigt. Die gewonnenen, doppelsträngigen Oligonukleotide konnten 3' markiert werden, indem 50 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 5 µl 10x *Bam*HI-Restriktionspuffer (Roche Diagnostics), 12,5 µl Nukleotidmix (A₂-Mix, Gibco BRL), 1 µl Klenow-Fragment (1U/µl) und 3 µl [α -³²P] dCTP inkubiert wurde. Nach 20 min bei RT wurde die Reaktion durch 10 min Erhitzen auf 75°C gestoppt und die markierten Doppelstrang-Oligonukleotide über eine Nick-Säule nach Angaben des Herstellers von den freien Nukleotiden getrennt. Die spezifische Markierung der Doppelstränge wurde über Messung der Cherenkow-Counts eines 1 µl, 3 µl und ein 5 µl Aliquots in einem Szintillationszählers quantifiziert.

A₂-Nukleotidmix (50 mM dATP, dGTP, dTTP; Gibco BRL)

[α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia)

2.4.8.2 Bindungsreaktion und Detektion der Protein-DNA-Komplexe

Proteinextrakte (0,15-20 µg; je nach Quelle) wurden mit dem Bindungspuffer unter Zugabe von 10 µg BSA und 1 µg Salmon Testes-DNA 10 min auf Eis vorinkubiert. Nach Zugabe von spezifischem (Oligonukleotid mit GLI-Bindungssequenz unmarkiert) oder unspezifischem (Oligonukleotid mit unspezifischer Sequenz unmarkiert) Kompetitor und einer weiteren Inkubation für 10 min auf Eis, wurden 20.000 cpm des spezifischen Oligonukleotids (ca. 0,5 ng) zur Bindungsreaktion gegeben, die damit ein Gesamtvolumen von 20 µl erreichte. Nach 10 minütiger Inkubation konnte der gesamte Reaktionsansatz auf das Gel aufgetragen werden. Bei Einsatz von Antiseren zur Identifikation der Proteine, konnte nach erneuter Zugabe von 2 µl Antikörperlösung und einer Inkuba-

tion von 10 min auf Eis der Gesamtansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Proben wurden dabei auf ein natives, 6% iges Polyacrylamidgel (Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid 75:1) niedriger Ionenstärke (0,5x TBE) nach einem Vorlauf aufgetragen und mit 100 Volt für ca. 2,5-3 h aufgetrennt. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel auf 3 Schichten Whatman-Papier transferiert, mit Saranfolie abgedeckt und auf einem Geltrockner unter Vakuum ca. 1 h getrocknet. Die markierten Protein-DNA-Komplexe bzw. die freien, markierten Oligonukleotide wurden durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Polyacrylamidgel; 6%, 75:1, nativ	30% Acrylamid:Bisacrylamid	4 ml
	(37,5:1)	
	Acrylamid (rein)	4 ml
	5X TBE	4 ml
	ddH ₂ O	27,6 ml
	Die Polymerisation des Gels wurde vor dem Gießen durch Zugabe folgender Komponenten gestartet:	
10% APS (w/v)	300 µl	
TEMED	34 µl	
Bindungspuffer (BSB-); 5X	HEPES; pH 7,5	50 mM
	DTT	5 mM
	EDTA	0,5 mM
	Glyzerin (v/v)	42,5%
	ZnSO ₄	25 µM
	MgCl ₂	31,25 mM
	NP-40 (v/v)	0,25%

BSA, 100x (10 mg/ml; MBI Fermentas)

Salmon Testes DNA (9,9 mg/ml; Sigma)

anti-N-GLI3 (Serum 711, diese Arbeit)

anti-C-GLI3 (Serum 071 oder 072, diese Arbeit)

Verpackungsfolie, Saran (Dow)

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Herstellung polyklonaler Antisera

In dieser Arbeit wurden für die Gewinnung polyklonaler Antisera gegen den Transkriptionsfaktor GLI3 bakteriell exprimierte Proteindomänen des Transkriptionsfaktors verwendet, die in Einschlußkörperchen abgelagert waren und als solche nach Aufreinigung für die Immunisierung in Kaninchen injiziert wurden.

Die exprimierten Proteinbereiche, die verwendeten Vektoren und die Klonierungsstrategie sind in Tab. 2 der Expressionsplasmide (Abschnitt 2.1.5) zusammengefaßt. Expression und Reinigung der Proteine sind in den Kapiteln 2.4.4 und 2.4.5 (Abschnitt 2.4) ausführlich beschrieben. Die Immunisierung der Kaninchen und die Serumgewinnung wurde von der Firma EUROGENTEC, Seraing/Belgien durchgeführt.

2.5.2 Aufreinigung der IgG-Antikörper aus Kaninchenserum mit Hilfe von Protein-A-Sepharose

Protein A Sepharose bindet die Fc-Region von Immunglobulinen vor allem der IgG-Klasse und ist daher ein gutes Hilfsmittel, um diese Immunglobuline aus Antisera anzureichern und entsprechend aufzureinigen. Für die Reinigung von 2 ml Serum wurden 500 mg Protein A Sepharose in 10 ml Wasser gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Dann wurde eine 10 ml Kunststoffsäule (BIO RAD) mit dem gequollenen Gelmaterial luftblasenfrei beladen und mit 10 Säulenvolumen (ca. 20 ml) 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 äquilibriert. Das Endvolumen der kompakten Gelmatrix betrug ungefähr 2 ml. Das zu reinigende Serum (2 ml) wurde mit 220 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0 versetzt, so daß die Endkonzentration an Tris 100 mM betrug, und auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf der Säule wurde aufgefangen und erneut über die Säule aufgereinigt. Nachdem dieser Vorgang dreimal wiederholt war, wurde die Säule nacheinander mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer 1 und 10 Säulenvolumen Waschpuffer 2 gewaschen. Die an die Protein A Sepharose gebundenen Antikörper wurden mit 5 ml 100 mM Glycin, pH 3,0 und 0,02%

Natriumazid eluiert und in zehn 500 µl Fraktionen gesammelt. Die Eluate mußten wegen des extremen pH-Wertes des Elutionspuffers sofort neutralisiert werden und wurden deshalb in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit vorgelegten 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0 aufgefangen. Dann wurden die Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen mit der Methode nach Bradford (2.4.3) bestimmt und die Eluate mit den höchsten Konzentrationen (meist Probe 5 und 6) vereinigt. Lag die Proteinkonzentration der vereinigten Eluate zusammen unter 1 mg/ml, so wurde zur Stabilisierung 1% BSA zugegeben. Die so gereinigten Antikörper wurden durch die Zugabe von 0,1% Natriumazid vor bakterieller Zersetzung geschützt und konnten bei 4°C für längere Zeit gelagert werden.

Die Protein A Sepharose-Säule wurde regeneriert, indem nach der eigentlichen Elution zusätzlich 3 Säulenvolumen Elutionspuffer und 3 Säulenvolumen Bindungspuffer, versetzt mit 0,1% Natriumazid, über die Säule liefen. Danach konnte sie gut verschlossen bei 4°C bis zu weiteren Aufreinigungen gelagert werden.

Äquilibriumspuffer	Tris-HCl; pH 8,0	100 mM
Waschpuffer 1/ Bindungspuffer	Tris-HCl; pH 8,0	100 mM
Waschpuffer 2	Tris-HCl; pH 8,0	10 mM
Elutionspuffer	Glyzin; pH 3,0 N ₃ Na (w/v)	100 mM 0,02%
Neutralisierungspuffer	Tris-HCl; pH 8,0	1 M

2.5.3 Immundetektion von Proteinen (Western Blot, Teil 2)

Bei dieser Methode werden Antiseren auf ein elektrophoretisch getrenntes und auf Nitrozellulose transferiertes Proteingemisch gegeben und die Bindung an das Antigen ermöglicht. Nach Zugabe eines zweiten Antikörpers, der Fc-Fragmente von Antikörpern der IgG-Klasse erkennt, oxidiert das an diesen Antikörper gekoppelte Enzym Peroxidase ein Substrat, welches dann bei der chemischen Umwandlung Licht aussendet, welches über Schwärzung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden kann.

Die nach dem Western Blot gewonnene Nitrozellulosemembran (Abschnitt 2.4.7) wurde vor der Immundetektion über Nacht bei 4°C, oder mindestens 1 h bei RT in "Blocking"-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Danach wurde die Membran einmal 15 min und darauffolgend dreimal 5 min in einem großzügigen Volumen PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde der proteinspezifische Primäantikörper in PBS-Tween mit BSA verdünnt und die Membran 1-2 h bei RT unter Schütteln in diesem Gemisch inkubiert. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Antikörper wurde erneut, wie oben angegeben, gewaschen. Zur Detektion des ersten Antikörpers wurde die Membran in einem Gemisch aus konjugatgekoppeltem Zweitantikörper mit PBS-Tween und BSA für ca. 1 h inkubiert und danach erneut gewaschen, wobei die einzelnen Waschschrte jeweils 15 min dauerten. Die so behandelte Membran war für eine Detektion der spezifischen Antikörperbindung über eine Chemilumineszenzreaktion bereit. Der Nachweis erfolgte über das ECL+Plus System von Amersham bzw. das ECL System von NEN™ Life Science nach den jeweiligen Angaben der Hersteller. Nach Ablauf der Nachweisreaktion wurde die überschüssige Flüssigkeit durch Abtropfen entfernt, die Membran in Saranfolie möglichst luftblasenfrei eingeschlagen und das Ergebnis über Belichtung von BIOMAX MR-Filmen in zeitlich absteigenden bzw. aufsteigenden Intervallen von 10, 5,1, 30, 60 und 90 Sekunden detektiert. Die für die Western-Blot Analyse verwendeten Erst- und Zweitantikörper sind in der folgenden Tabelle 5 zusammengefaßt.

1. Antikörper	Verdünnung	Blockpuffer	2. Antikörper	Verdünnung	Blockpuffer
anti-N-GLI3, Serum 710, 4,9 mg/ml, diese Arbeit	1:1000	PBS-Tween plus 3% BSA	anti-Kaninchen / Peroxidase, Amersham	1:2000	PBS-Tween plus 1% BSA
anti-N-GLI3, Serum 711, 2,94 mg/ml, diese Arbeit	1:500	PBS-Tween plus 3% BSA	anti-Kaninchen / Peroxidase, Amersham	1:2000	PBS-Tween plus 1% BSA
anti-C-GLI3, Serum 070, 2,9 mg/ml, diese Arbeit	1:1000	PBS-Tween plus 3% BSA	anti-Kaninchen / Peroxidase, Amersham	1:2000	PBS-Tween plus 1% BSA

1. Antikörper	Verdünnung	Blockpuffer	2. Antikörper	Verdünnung	Blockpuffer
anti-C-GLI3, Serum 072, 3,14 mg/ml, diese Arbeit	1:1000	PBS-Tween plus 3% BSA	anti-Kaninchen / Peroxidase, Amersham	1:2000	PBS-Tween plus 1% BSA
anti-GFP, 100 µg/ml, CLONTECH	1:100	PBS-Tween plus 1% BSA	anti-Kaninchen / Peroxidase, Amersham	1:2000	PBS-Tween plus 1% BSA

Tab. 5: In der Western Blot-Analyse verwendete Erst- und Zweitantikörper. Angegeben sind die Reaktionsbedingungen, die entsprechenden Verdünnungen und die Bezugsquellen.

Die Wiederverwendung eines Western Blots mit einem anderen Erstantikörper ist nach Entfernung der gebundenen Antikörper möglich, aber es kann dabei zu einem Verlust des spezifisch an der Membran gebundenen Proteins kommen. Aus dem Grund wurde diese Methode nur für Kontrollen eingesetzt. Dazu wurde der Blot nach der Behandlung mit dem ECL-System kurz in PBS gewaschen, dann mit „Stripping“-Puffer überschichtet und für 30 min in einem 50°C Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS für ca. 10 min konnte mit der bereits erwähnten Absättigungs-Reaktion der Membran fortgefahren werden.

PBS-Tween	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	80 mM
	NaH_2PO_4	20 mM
	NaCl	100 mM
	pH 7,5 einstellen	
	Tween-20 (v/v)	0,1%

"Blocking"-Puffer, 5% (w/v) (Blocking reagent, Amersham Pharmacia)

Verpackungsfolie, Saran (Dow)

„Stripping“-Puffer	β -Mercaptoethanol	100 mM
	SDS (w/v)	2%
	Tris-HCl, pH 6,7	62,5 mM

2.5.4 Immunhistochemischer Nachweis von rekombinanten Proteinen nach Transfektion bzw. endogen exprimierten Proteinen

2.5.4.1 Immunhistochemischer Nachweis von rekombinanten GFP-Fusionsproteinen in transfizierten Zellen

Zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von Proteinen kann man diese in einen GFP-Expressionsvektor klonieren, transient transfizieren und die gebildeten Fusionsproteine mittels der Fluoreszenzeigenschaft des GFP, direkt *in vivo* oder nach Fixierung der Zellen, detektieren.

Alle in dieser Arbeit verwendeten GLI3-GFP Fusionskonstrukte sind in Tabelle 2 der Expressionsplasmide (Abschnitt 2.1.5) mit der jeweiligen Klonierungsstrategie zusammenfassend aufgeführt. Die Methode der transienten Transfektion von Zellen in Lab-Tek II Chamber slides ist unter 2.3.2.2 ausführlich beschrieben.

24 - 48 h nach Transfektion wurde das Medium aus den je 2 Inkubationskammern abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach Entfernen der Inkubationskammern wurden die auf den Objektträgern befindlichen Zellen erneut für 1,5 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen zur Fixierung für 1,5 min in einem PBS-Azeton-Gemisch inkubiert und mit reinem Azeton für 1,5 min fixiert. Der Einwirkung von kaltem Azeton (2-6°C) für 3 min unter leichtem Schütteln folgte die Lufttrocknung der Präparate. Nach einer Gegenfärbung mit DAPI für ca. 3 min, dem Spülen der Objektträger in ddH₂O und der erneuten Lufttrocknung, konnten die Zellen eingedeckt werden. Dazu wurde auf jeden Ansatz je 1 Tropfen „VECTASHIELD“ aufgetropft, die beiden Präparate auf einem Objektträger mit einem großen Deckgläschen zugedeckt und mindestens 1h im Kühlschrank in einer Kartonmappe getrocknet. So gelagert, waren die Färbungen der Zellen über Monate stabil und konnten auch über diesen Zeitraum ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss) mit Epifluoreszenzeinrichtung und gekühltem CCD-Kameraaufsatz. Die computergesteuerte Bildauswertung der mit DAPI- und FITC (für GFP-Fluoreszenz)-Filter durchgeführten Aufnahmen erfolgte mit der Software Smarte Capture. Die konfokalen Aufnahmen wurden im Institut für Anatomie und Zellbiologie von Prof. H. P. Elsässer erstellt.

PBS (für die Zellkultur, Roche)

Azeton-PBS-Gemisch (1:1, PBS für die Zellkultur)

DAPI-Färbelösung	DAPI-Stammlösung	15 µl
	auf 50 ml PBS (für die Zellkultur)	

VECTASHIELD Mounting Medium for Fluorescence (Vecta Laboratories)

2.5.4.2 Immunhistochemischer Nachweis von endogen exprimierten Proteinen bei transient transfizierten Zellen

Die Präparate für diese Experimente wurden wie bereits in 2.5.4.1 beschrieben, hergestellt. Allerdings sollten in diesem Fall nicht nur die GLI3-GFP Fusionsproteine detektiert werden, sondern zusätzlich zelluläre Filamente über chemische Substanzen oder spezifische Antikörper dargestellt werden. Die Aktinfilamente wurden dabei über TRITC-gekoppeltes Phalloidin, Tubulin, Vimentin und die Cytokeratine über TRITC-konjugierte Antikörper sichtbar gemacht. Nach Ablauf der Transfektionsinkubationszeit der Fusionskonstrukte, wurde das Medium aus den je zwei Kammern der Objektträger abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Inkubationskammern auf den Objektträgern wurden entfernt, die Zellen 5 min mit Methanol fixiert und für 5 min in Azeton permeabilisiert.

Die Darstellung der Aktinfilamente fand durch Inkubation der Präparate mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin für 10 min und fünfmaligem intensivem Spülen mit PBS statt. Die Zellkerne wurden mit DAPI für 3 min gegengefärbt und die Ansätze nach Lufttrocknung, wie unter 2.5.4.1 bereits beschrieben, eingedeckt und ausgewertet.

Bei der Darstellung der zellulären Strukturen über spezifische Antikörper wurde nach der Permeabilisation der Zellen mit Azeton kurz in PBS gespült, der jeweilige Antikörper in PBS verdünnt und 30 min mit den Zellen inkubiert. Nach intensivem Waschen zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Erstantikörpern, wurden die Zellen 30 min im PBS-verdünnten Zweitantikörper inkubiert, dann von ungebundenem Sekundärantikörper befreit und nach Gegenfärbung mit DAPI wie bereits beschrieben eingedeckt und ausgewertet. Da die zusätzlichen Färbungen bei diesen Experimenten jeweils über eine TRITC-Kopplung lief, mußten am Fluoreszenzmikroskop diese Aufnahmen zusätz-

lich mit dem entsprechenden TRITC-Filter dokumentiert werden. Die zur Darstellung der zellulären Filamente verwendeten Erst- und Zweitantikörper sind in der Tabelle 6 aufgeführt.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
anti- α -Tubulin, Serotec	1:10	anti-Ratte-IgG-TRITC, Sigma	1:160
anti-Vimentin, Monosan Sun Bio	1:3	anti-Maus-TRITC, Dianova	1:100
anti-Pan-CK, Dako	1:100	anti-Maus-TRITC, Dianova	1:100
anti-CK-18, A.Holzbach	1:3	anti-Maus-TRITC, Dianova	1:100

Tab. 6: In der Immundetektion von Proteinen in Zellen verwendete Erst- und Zweitantikörper. Angegeben sind die jeweiligen Verdünnungen und die Referenz der Antikörper.

Alle weiteren benötigten Lösungen sind bereits im vorhergehenden Abschnitt aufgelistet.

2.6 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Nukleinsäuren wurde die von Sanger und Mitarbeitern 1977 entwickelte enzymatische DNA-Sequenzierung, auch als statistisches Kettenabbruch-Verfahren bekannt, verwendet. Dabei werden zur Sequenzierung DNA-Polymerasen eingesetzt, denen als Substrat neben den 2'-Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs) auch 2'-3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate (ddNTPs), denen eine freie 3'-Hydroxylgruppe fehlt, zur Verfügung gestellt. Zur Synthese muß der abzulesende DNA-Strang (Matrize) als Einzelstrang vorliegen, an den sich ein kurzes Oligonukleotid als Primer an die komplementäre Sequenz anlagert. Am freien 3'-Hydroxylende dieser Sequenz werden nun durch die Polymerase dNTPs eingebaut. Der Einbau der Dideoxy-Verbindungen in einen frisch synthetisierten DNA-Strang bewirkt einen Kettenabbruch der Synthese. Statistisch kommt es dabei an jedem Nukleotid der Matrize zu Abbrüchen, so daß ein Gemisch von DNA-Strängen mit identischem 5'-Ende, aber variablem 3'-Ende, d.h. unterschiedlicher Länge entsteht. Bei der Verwendung von *Taq* DNA-Polymerase kommen zusätzliche Vorteile zum Tragen, da die Reaktion aufgrund der Hitzestabilität des Enzyms bei höheren Temperaturen durchgeführt werden kann, und eine Renaturierung des DNA-Doppelstranges verhindert wird. Darüber hinaus kann

in mehreren Zyklen denaturiert werden und somit können bereits aus geringen Mengen an Matrizen detektierbare Signale erhalten werden.

In dieser Arbeit wurde das ABI Prism BigDYE™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction System verwendet. Zum Einsatz kommen dabei sogenannte BigDYE Terminatoren (ddNTPs), die mit verschiedenen Fluoresceinen markiert sind: für ddATP (grün) ist dies dichloro[R6G], für ddGTP (blau) dichloro[R110], für ddTTP (gelb/schwarz) dichloro[TAMRA] und für ddCTP (rot) ist der Terminator dichloro[ROX]. Ihre Absorptionsspektren unterscheiden sich so weit voneinander, daß sie bei Anregung durch Bestrahlung mit einem 488 nm-Argon-Laser und passendem Filterrad vier photometrisch eindeutig erfaßbare Einzelsignale ergeben. Das verwendete BigDYE Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction System von ABI enthielt alle für die Reaktion benötigten Komponenten, *AmpliTaq* DNA-Polymerase, markierte ddNTPs und nicht markierte dNTPs im passenden Reaktionspuffer. Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit zur Überprüfung des Leserasters nach Klonierung und zur Kontrolle der *in vitro* Mutagenesen eingesetzt.

2.6.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 100-300 ng DNA (aus der Mini- oder Maxipräparation von Plasmid-DNA, QIAGEN) in HPLC-H₂O mit 1 µl Primer und 8 µl Terminationsmix versetzt und das Gesamtvolumen auf 20 µl mit HPLC-H₂O aufgefüllt. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer, mit einer Konzentration von 3,2 pmol, sind in Tabelle 3a (Abschnitt 2.1.6) zusammengestellt. Die Sequenzierungen wurden in der Regel mit folgendem Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 94°C für 5 Minuten, danach 28 Zyklen mit einer Denaturierungsphase von 15 Sekunden bei 94°C, einer Anlagerungsphase von 10 Sekunden bei 51°C und einer Synthesephase von 4 Minuten bei 60°C. Nach einer abschließenden Synthese für 7 Minuten bei 60°C, wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Die Proben konnten danach bei -20°C lichtgeschützt gelagert werden, oder direkt für die Auswertung auf dem Sequenzierer aufgearbeitet werden.

HPLC-H₂O (Merck)

2.6.2 Aufreinigung der Sequenzansätze

Zur Entfernung der störenden Komponenten (z.B. Terminatoren) im Reaktionsansatz wurden die synthetisierten DNA-Stränge über eine Ethanol-fällung gereinigt. Der 20 µl Reaktionsansatz wurde mit 4 µl 3 M Na-Azetat (pH 4,6) und 100 µl EtOH 96% rein versetzt, gut gemischt und 15 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde das Gemisch für 20 min bei RT mit 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 1-2 mal mit 70% EtOH rein gewaschen. Nach Lufttrocknung konnte das Sediment in Auftragspuffer aufgenommen und ausgewertet werden, oder war bei -20°C für ca. 1 Monat stabil.

Na-Azetat; 3 M, pH 4,6

2.6.3 Sequenzierung von PCR-Produkten

Einige der Plasmid-DNAs, vor allem die nach Mutagenese gewonnenen DNA, waren problematisch bei der direkten Sequenzierung. Da neben den spezifischen Primern der Vektorplasmide auch GLI3-genspezifische Primer im Labor vorhanden waren, konnten diese sowohl zur direkten Sequenzierung der Plasmide, als auch im Anschluß an die Synthese von PCR-Produkten verwendet werden. Alle verwendeten genspezifischen Sequenzierprimer sind in Tabelle 3a mit Position in der cDNA, 5'-3' Sequenz und Template angegeben.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der selektiven Anreicherung von gewünschten Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge. Unter optimalen Bedingungen kommt es zu einer exponentiellen Anhäufung des Amplifikats auf bis zu 10^7 -fach. Die DNA-Polymerase benötigt hierzu eine kurze doppelsträngige Startersequenz (Primer), die durch die Anlagerung kurzer synthetischer Oligonukleotide bereit gestellt wird. Außerdem muß eine ausreichende Menge an, für den Einbau in die neu zu synthetisierende DNA benötigten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) und eine definierte Zusammensetzung an Salzionen im Reaktionspuffer vorhanden sein. Die Verwendung einer hitzestabilen *Taq* DNA-Polymerase, die ein Temperaturoptimum von über 70°C besitzt und die für kurze Zeit auch bei Temperaturen von bis zu 95°C stabil ist, dient zur Polymerisierung des neuen DNA-Doppelstranges und ermöglicht die wiederholte Hitzedenaturierung zu einzelsträngigen DNA-Matrizen, ohne daß das Enzym inaktiviert wird. Die

Anlagerungstemperatur der verwendeten Oligonukleotide richtet sich nach ihrer Basenzusammensetzung und Länge. Je höher diese Temperatur liegt, um so spezifischer kann ein Amplifikat entstehen.

Die für die Sequenzierung eingesetzten PCR-Produkte wurden mit den „Ready-To-Go PCR beads“ von Amersham Pharmacia generiert. In diesem Fertigsystem sind alle für die Reaktion wichtigen Komponenten in der optimalen Zusammensetzung enthalten und nach Zugabe des spezifischen Templates (hier 25 ng Plasmid-DNA), des benötigten Primerpaares (100 ng/μl) und einer definierten Menge von Ampuwa-H₂O (Fresenius; Reaktionsansatz auf 25 μl auffüllen) kann die Reaktion gestartet werden. Die Reaktion lief dabei nach folgendem Schema ab:

Initialdenaturierung	5 min	94°C
32 Zyklen zur exponentiellen Anreicherung		
Denaturierung	30 sec	94°C
Hybridisierung der Primer	30 sec	ca. 50-60°C
Synthese	30 sec	72°C
Finale Synthese	3 min	72°C

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert und jeweils eine Negativkontrolle (enthält alle Komponenten außer der DNA) mitgeführt. Für die Reaktion wurden Thermocycler mit beheizbaren Deckeln verwendet, die nach Abschluß der Reaktion die Proben auf 4°C lagerten. Die so gewonnenen PCR-Produkte konnten bei -20°C gelagert werden, oder sofort zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

2.6.3.1 **Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung**

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel bezüglich der spezifischen Amplifikation des zu erwartenden Fragmentes kontrolliert und danach aufgereinigt. Zur Entfernung von für die Sequenzierung störenden Komponenten wurde das QIAquick PCR Purifikations Kit eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte lag, nach Doppelanatz der PCR-Reaktion und anschließender Vereinigung der beiden Reaktionsansätze, zwischen 50-70 ng/μl. Für die Sequenzreaktion wurden 70 ng aufgereinigtes PCR-

Produkt benötigt. Die Sequenzreaktion und alle weiteren Vorgehensweisen sind bereits unter 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben.

2.6.4 Auswertung der Sequenzanalysen

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der an den ABI Prism 373A oder ABI Prism 310 DNA Sequencern angegliederten Software, der Version 1.2.1 der Data Collection und die Sequencing Analysis Software (Version 2.1.1). Sequenzanalysen wurden mit der MacIntosh-Anwendung Sequence Navigator (Version 1.0) durchgeführt.

NF-Harnstoff, Rotiphorese (Roth)

NF-10x TBE-Puffer (Roth)

Long Ranger Gel Solution, 50% Stock (Bio Whittaker)

Spritzenfilter; 0,2 µm (Satorius)

Probenauftragspuffer, Formamid und EDTA (50 mM) im Verhältnis 5:1

POP-6 Polymer Gelmatrix, ABI Prism 310 (Perkin Elmer)

2.7 Gerichtete Mutagenese

Die sogenannte *in vitro* site-directed Mutagenese ist eine Methode zur Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA, die Aminosäureaustausche, Deletionen bzw. Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren bewirkt. Die auf diese Art in ein Expressionsplasmid eingeführten Mutationen, können auf ihre Auswirkungen auf das rekombinante Protein getestet werden.

Plasmid-DNA mit dem zu manipulierenden Insert wird über Denaturierung zu Einzelsträngen, an die sich komplementäre Oligonukleotidprimer mit der einzuführenden Mutation anlagern. Diese Primer werden über die Aktivität der *Pfu* DNA-Polymerase zu zirkulären Plasmidsträngen verlängert, die am Syntheseende offen sind. Die durch mehrere Zyklen entstandenen mutierten Plasmide sind nicht methyliert und können über

einen methylierungssensitiven *Dpn* I-Verdau der Ausgangsplasmid selektiert werden. Die noch offene Vektor-DNA mit der eingefügten Mutation wird über eine Transformation in Bakterien eingeführt und kann dann als stabile Plasmid-DNA nach Amplifikation für weitere Experimente eingesetzt werden kann.

Die in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseprimer und die zugehörigen Templates sind in Tabelle 3c (Abschnitt 2.1.6) zusammengefaßt. Dabei wurden die Primer entsprechend den Angaben des Herstellers generiert und die Mutagenesen in verschiedenen Ansätzen nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die Mutagenesereaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Initiale Denaturierung	5 min	95°C
Anzahl der Amplifikationszyklen je nach Art der Mutation von 14-18		
Denaturierung	30 sec	95°C
Primeranlagerung	1 min	55°C
Synthese (2 min/ kb Plasmidlänge)	14-21 min	68°C
Lagerung		4°C

Die eingesetzten DNA-Mengen der Ausgangsplasmide lagen bei 5, 7.5, 10 und 15 ng. Die Mutageneseansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt und mit ca. 30 µl Paraffinöl überschichtet. Nach Ablauf der Zyklen wurde der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert, dann 10 U *Dpn* I zugegeben und erneut für 1 h bei 37°C inkubiert. 1 µl dieses Verdauansatzes wurde zur Transformation nach Angaben des Herstellers von *Epicurian Coli* XL1-Blue superkompetenten Zellen verwendet. Die erfolgreiche Integration der Mutation in die Plasmid-DNA wurde über Sequenzierung (2.6.1 und 2.6.3) kontrolliert.

Die Größe einiger Expressionsplasmide (≥ 9 kb) machte die Durchführung einer erfolgreichen Mutagenese unmöglich. In diesen Fällen wurde die Mutationen zunächst in andere, kleinere Expressionsplasmide eingefügt und die mutierte Stelle im Anschluß daran, unter Beachtung der Leseraster, in ein entsprechendes zweites Wirtsexpressionsplasmid umklontiert. Diese Strategie zur Gewinnung von mutierter Plasmid-DNA wurde ebenfalls in Tabelle 3c dokumentiert.

QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Paraffinöl

2.8 Sicherheitsmaßnahmen

Bei allen Arbeiten wurden die gültigen Vorschriften des Gentechnikrechts eingehalten. Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen und mit prokaryontisch gentechnisch veränderten Organismen (GVO) erfolgten in einem Labor der Sicherheitsstufe 1. Die durch gentechnologischen Arbeiten kontaminierten Lösungen, Gefäße und Abfälle wurden autoklaviert.

Arbeiten mit radioaktiven Materialien wurden in den dafür vorgesehenen Laborräumen unter Beachtung der Schutzmaßnahmen durchgeführt. Die radioaktiven Abfälle wurden entsprechend der Strahlenschutzverordnung gesammelt und entsorgt.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung polyklonaler Antisera gegen den Transkriptionsfaktor GLI3

Funktionelle Studien zu einem Protein von Interesse greifen sehr häufig auf spezifische Antikörper gegen dieses Protein zurück, um seine Anwesenheit zweifelsfrei zu erkennen. Zur funktionellen Charakterisierung von GLI3 wurden in der vorliegenden Arbeit Antikörper gegen dieses GLI-Protein genutzt.

Versuche mit kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen GLI3 erbrachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Western Blot Analysen und Gelretardierungsexperimente mit diesen, über Peptidimmunisierung gewonnenen Antisera schlugen fehl und führten zu dem Entschluß, eigene, gegen GLI3 gerichtete Antikörper, zu generieren. Dabei wurde auf das Verfahren der Immunisierung mit rekombinant exprimierten Proteinbereichen zurückgegriffen. Dazu wurden Proteinbereiche von besonderem Interesse, im vorliegenden Fall die N- und C-terminalen Enden des GLI3-Proteins, in bakterielle Expressionsvektoren kloniert. Das Protein wurde unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert und nach Aufreinigung zur Immunisierung eingesetzt. Das gewonnene Antiserum wurde aufgearbeitet und dann für nachfolgende Experimente eingesetzt.

3.1.1 Klonierung und bakterielle Expression von GLI3-Proteindomänen

Da trotz korrekter Leserasterklonierung oft nicht alle Peptidbereiche eines Proteins stabil exprimiert werden, wurden für die rekombinante Expression der gewünschten amino- und carboxyterminalen *GLI3*-Abschnitte verschiedene Expressionssysteme und Proteinbereiche ausgewählt. Die in Tabelle 2 (2.1.5) aufgeführten Expressionsvektoren repräsentieren nur die Konstrukte, die zu ausreichenden Proteinmengen für eine Immunisierung geführt haben. Der N-Terminus von GLI3, hier repräsentiert durch die Aminosäuren 176-554 des Gens, wurde in das pET3-Expressionssystem kloniert. Dieses bietet nach erfolgreicher Proteininduktion die Möglichkeit, die Fusionsproteine über an Agarose-beads gekoppelte Antikörper gegen ein enthaltenes N-terminales „T7•Tag“ aufzureinigen. Zwei C-terminalen Bereiche von GLI3, die zum einen die Domäne 7 (Aminosäuren 1321 bis 1580), zum anderen die Homologiedomänen 6 und 7 der *GLI*-

Genfamilie (Aminosäuren 1044 bis 1580) umfassen, ließen sich im pRSET-System ausreichend exprimieren. Mit diesem System werden N-terminale Fusionsproteine generiert, bei denen das rekombinante Protein mit sechs Histidinresten gekoppelt ist. Die Metall-Chelat-Bindungseigenschaft von Histidin kann genutzt werden, die Proteine über eine Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säule anzureichern. In Abbildung 9 sind die Bereiche von GLI3, die als Proteine exprimiert und zur Immunisierung verwendet wurden, schematisch im Vergleich zum Gesamtprotein dargestellt.

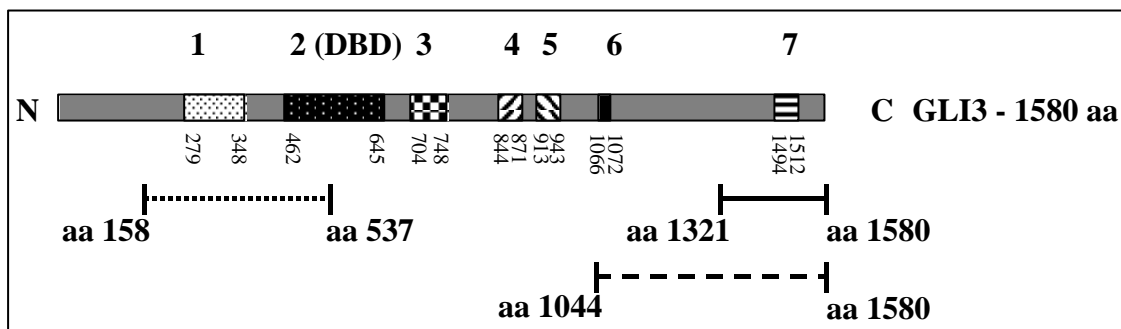


Abb.9: Schematische Darstellung der GLI3-Bereiche, die zur bakteriellen Expression kloniert wurden. Das gesamte GLI3 Protein wird durch den grauen Balken repräsentiert. Die enthaltenen Boxen stehen für die 7 Homologiedomänen innerhalb der GLI-Genfamilie. Ihre jeweilige Lage ist über die erste und letzte Aminosäureposition der Domäne angegeben. Die Linien unterhalb des GLI3-Schemas repräsentieren die klonierten Bereiche mit den eingrenzenden Aminosäurepositionen (aa). (DBD = DNA bindende Domäne)

Nachdem die korrekte Leserasterklonierung über eine Sequenzierung Vektor-Insert-Übergänge verifiziert worden war, wurden die Konstrukte in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS eingebracht und die Proteinexpression induziert. Zur Kontrolle, ob eine Proteininduktion vorhanden war, wurden vorab Expressionsstudien in einer 50 ml Kultur durchgeführt. Während der 3 stündigen Induktionsphase wurden Aliquots der Kulturen mit und ohne Zugabe von IPTG entnommen und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Durch eine anschließende Coomassie-Färbung konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Bei erfolgreicher Induktion wurde die Kultur in einem präparativen Maßstab von 500 ml Medium angesetzt, um genügend rekombinantes Protein zur Immunisierung zu gewinnen. In Abbildung 10 wird exemplarisch die Induktion des Fusionsproteins, das N-terminale Bereiche von GLI3 enthält, dargestellt.

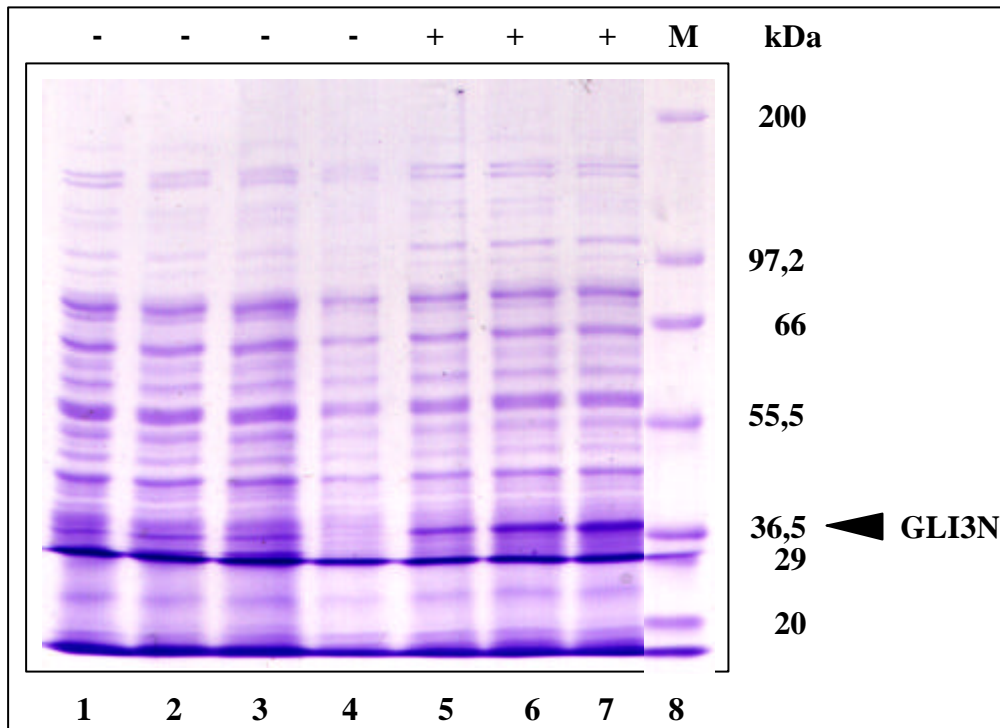


Abb. 10: Induktionskontrolle der bakteriell exprimierten, rekombinanten GLI3-Proteinbereiche am Beispiel des aminoterminalen Expressionskonstruktes pET3aGLI3/176-554. Die Spuren 1-3 repräsentieren Aliquots nach 1-, 2- und 3-stündiger Inkubation von nicht induzierten Kulturen. Spur 4 zeigt den Leerwert der induzierten Kultur, d.h. vor Zugabe von IPTG. Aliquots von der 1-, 2- und 3-stündigen Inkubation nach IPTG-Zugabe sind in den Spuren 5-7 dargestellt. Der Marker (M) zum Vergleich des Molekulargewichts ist in Spur 8 zu sehen. Induzierte Proteinbanden sind mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.

3.1.2 Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Wie in Abschnitt 3.1.1 bereits erwähnt, kodierten die verwendeten Expressionsvektoren sogenannte „Tags“, die in einem Fusionsprotein an das klonierte Peptid gekoppelt wurden. Die Anwesenheit solcher Proteinanhängsel ermöglicht in der Regel die unkomplizierte Aufreinigung der rekombinanten Proteine über standardisierte Methoden bis zu einem hohen Reinheitsgrad. Die Aufreinigung der GLI3-Fusionsproteine war aber durch den Einsatz einer T7•Affinitätssäule bzw. einer Nickelsäule, selbst unter stark denaturierenden Bedingungen (Harnstoffkonzentration 8M), nicht möglich. Die in Einschlußkörperchen (inclusion bodies) abgelagerten, exprimierten Proteine wurden deshalb über Waschschrte mit unterschiedlichen, detergenshaltigen Puffern aufgereinigt. Aus präparativen Kulturen von 500 ml wurden nach Induktion jeweils ca. 2 mg

aufgereinigtes Protein gewonnen. Das so angereicherte rekombinante Protein konnte direkt zur Immunisierung eingesetzt werden.

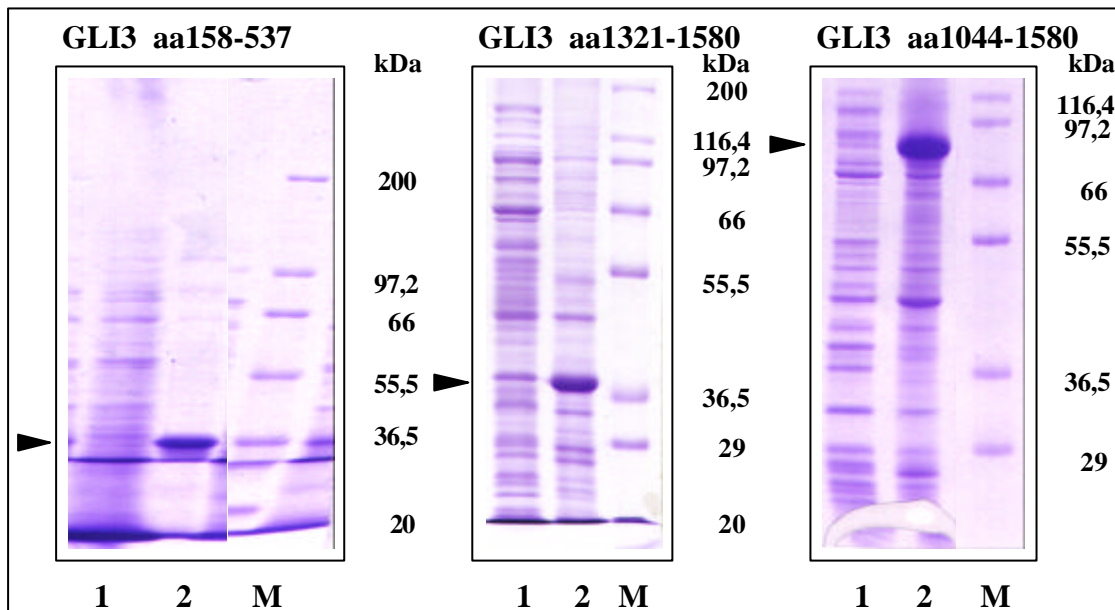


Abb. 11: SDS-PAGE der aufgereinigten Einschlusskörperchen nach Coomassie Blau Färbung. Die GLI3 Bereiche in den rekombinanten Proteinen sind durch die Positionen der enthaltenen Aminosäuren gekennzeichnet (vgl. Abbildung 9). In Spur 1 sind jeweils die löslichen Proteine der Bakterien nach Lysozym- und DNase-Behandlung aufgetragen. Spur 2 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in den aufgereinigten Einschlusskörperchen. Beide Spuren enthalten annähernd die gleiche Proteinmenge. Die über die Konstrukte exprimierte Proteine sind stark angereichert (Pfeilspitze). Der Markerlauf ist mit M gekennzeichnet.

3.1.3 Gewinnung und Aufreinigung polyklonaler Antisera gegen die N-terminalen und C-terminalen Bereiche von GLI3

Die Immunisierung der Kaninchen und die Gewinnung der Antisera wurde der Firma EUROGENTEC übertragen. Vorab wurden die Prä-Immunsere der einzelnen Antikörperfraktionen getestet, um von der Immunisierung unabhängige, unspezifische Reaktionen detektieren zu können. Bei einer Verdünnung von 1:100 des Prä-Immunsers war allerdings kein nennenswert unspezifischer Hintergrund zu ermitteln (Daten nicht gezeigt).

Die Empfindlichkeit der Antikörper gegen das GLI3-Protein konnte anhand von Verdünnungsreihen der zur Immunisierung verwendeten rekombinanten Proteine nach Auftrennung durch eine SDS-Page ermittelt werden. Der Proteinnachweis fand mit dem

jeweiligen Serum in einer Verdünnung von 1:3000 im Western Blot statt. Die niedrigste zu detektierende Konzentration des spezifischen Proteins gibt einen Hinweis darauf, wie effektiv das Antiserum in der Lage ist, dieses zu identifizieren. Serum 711, gegen den N-Terminus von GLI3 gerichtet, detektierte bei einer Verdünnung von 1:3000 noch 10 ng der aufgereinigten Proteine des zu erwartenden Gewichtes. Die gegen die GLI3-Domäne 7 bzw. die Domänen 6+7 gerichteten Antikörper (Serum 069 und Serum 072) konnten 50 bzw. 25 ng aus Einschlußkörperchen gereinigtes Protein nachweisen. Dabei war es entscheidend, daß mit zunehmender Serumverdünnung die unspezifischen Hintergrundbanden schwächer wurden, während das spezifische Protein weiterhin nachweisbar blieb. In Abbildung 12 sind die Western Blot-Ergebnisse zu den Nachweisgrenzen der einzelnen Antiseren zusammengestellt.

Für Folgeexperimente wurden die nach Immunisierung gewonnenen Kaninchenserum zusätzlich über eine Protein A-Säule aufgereinigt. Durch das bakterielle Protein A von *Staphylococcus aureus*, welches eine hohe Affinität zum konstanten Anteil der IgG Antikörper hat, kommt es zu einer Anreicherung dieser Antikörperklasse bei der oben genannten Aufreinigung. Das mehrfache Immunisieren mit einem spezifischen Antigen erhöht genau diese Subpopulation von immunreaktiven Faktoren im Serum, so daß die GLI3-spezifischen Antikörper der IgG-Klasse nicht nur von den restlichen Serumproteinen getrennt, sondern gleichzeitig konzentriert wurden.

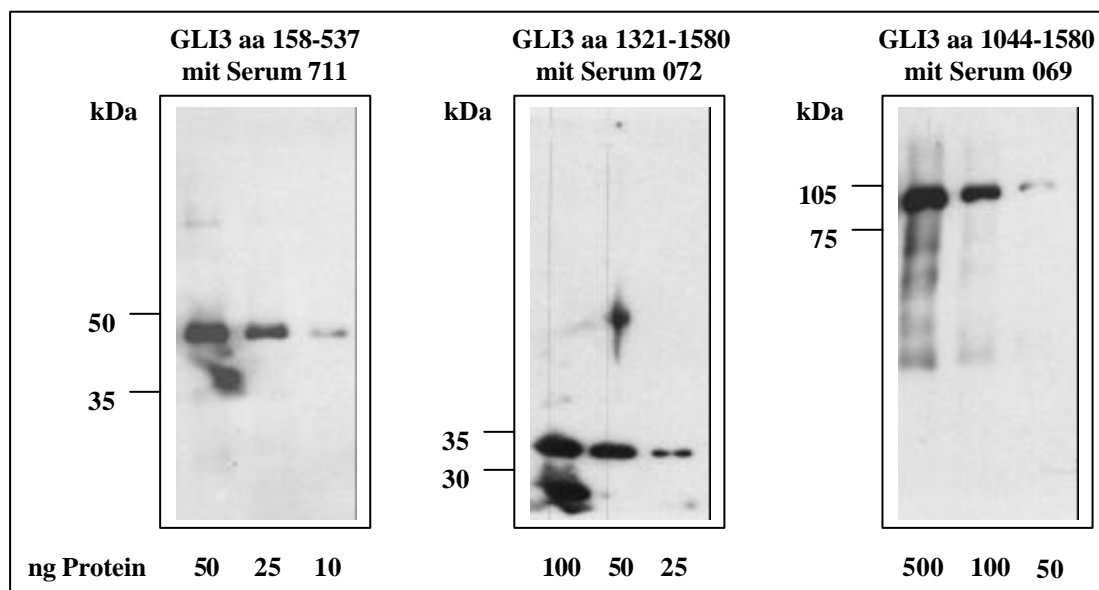


Abb. 12: Spezifische Erkennung der zur Immunisierung eingesetzten Proteine durch die jeweiligen Antiseren. Verdünnungsreihen der in den aufgereinigten Einschlußkörperchen konzentrierten Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Eine Anti-

serenverdünnung von je 1:3000 detektierte die Proteine entsprechender Größe. In der linken Abbildung ist zu erkennen, daß das Serum 711 unter diesen Reaktionsbedingungen noch eine Menge von ca. 10 ng des spezifischen Proteins eindeutig identifiziert, während Serum 072 (Mitte) nur eine Konzentration von ca. 25 ng detektieren kann. Das Serum 069 benötigt eine Proteinmenge von ca. 50 ng für eine eindeutige Identifikation des Zielproteins.

3.2 DNA-Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors GLI3

Eine entscheidende Eigenschaft eines Transkriptionsfaktors (TF) ist die Fähigkeit, eine spezifische DNA-Sequenz zu erkennen, sie zu binden und damit die Regulation seiner Zielgene zu beeinflussen. Die DNA-Bindungsdomäne bei GLI3 das Strukturmotiv der C₂H₂-Zinkfinger, wobei zwei konservierte Cystein- und Histidinreste ein zentrales Zinkatom komplex binden, wodurch die eigentliche Fingerstruktur entsteht. Fünf dieser Strukturen, hintereinander geschaltet, machen die komplette Bindungsdomäne von GLI3 aus. Um Aussagen über eine spezifische DNA-Bindung *in vitro* treffen zu können, nutzt man Gelretardierungsexperimente. Bei diesem Verfahren stellt man ein Doppelstrangoligonukleotid her, welches die Erkennungssequenz eines DNA-bindenden Proteins enthält (GLI-Konsensussequenz: -TGGGTGGTC-). Läßt man diese spezifische DNA-Sequenz nach radioaktiver Markierung mit dem zu testenden Transkriptionsfaktorprotein interagieren, so entstehen unter definierten Reaktionsbedingungen DNA-Protein-Komplexe. Detektiert wird diese DNA-Protein Interaktion über eine Veränderung im Laufverhalten des markierten GLI-Erkennungssequenzoligos. Unter nativen Bedingungen bewegt sich der Komplex langsamer im elektrischen Feld und kann deshalb auf einem Polyacrylamidgel als retardierte Bande im Vergleich zur ungebundenen Erkennungssequenz detektiert werden. Diese Komplexbildung wird durch Zugabe von unmarkiertem, spezifischem Oligonukleotid, auch spezifischer Kompetitor genannt, beeinflußt, nicht aber durch Zugabe einer unspezifischen DNA-Erkennungssequenz (unspezifischer Kompetitor). Setzt man zur Reaktion ein Proteingemisch ein, so kann die Spezifität der Bindung über ein gegen das Protein gerichtetes Antiserum detektiert werden. Im Fall der Antikörperbindung kommt es durch eine erneute Größenzunahme zu einer zusätzlichen Retardierung im Laufverhalten des DNA-Proteinkomplexes, einem sogenannten „supershift“.

Die Funktion der GLI3-Bindungsdomäne wurde in der Wildtyp-Sequenz und nach Mutation über Gelretardierungsexperimente getestet.

3.2.1 Gelretardierungsexperimente mit Wildtyp-GLI3 aus Zell-extrakten

Die endogene GLI3-Expression in den untersuchten Zelllinien war vorab auf Transkript-Ebene (Northern Blot Analysen in Jacobsen, 1996 und Topp, 1997) bestätigt worden und wurde genutzt, um Bindungsstudien für das GLI3-Protein durchzuführen. Nach Andrew und Faller, 1991 gewonnene Kernextrakte von NCI-H661 Zellen wurden unter definierten Pufferbedingungen mit einer Salzkonzentration von 190 mM KCl mit spezifischem, markierten Oligonukleotid inkubiert. Um die Spezifität der Protein-DNA Interaktion zu ermitteln, wurden Reaktionsansätze, bei denen das Proteingemisch der Zellen zuvor mit entweder *GLI*-Bindungsstellen-Oligonukleotid, oder mit einem Oligo unspezifischer Sequenz inkubiert. Im Anschluß daran fand die eigentliche Bindungsreaktion mit dem markierten Reaktionspartner statt. Eine eindeutige Identifikation des interagierenden Proteins der Kernextrakte fand über eine abschließende Inkubation mit den anti-GLI3-Antikörpern statt. Die entstandenen Komplexe und ihr Laufverhalten wurden über ein natives Polyacrylamidgel ausgewertet. Wie in Abbildung 13 dargestellt, kann die Bildung von zwei spezifischen DNA-Proteinkomplexen (ein deutlicher und ein schwächerer darunter, Spur 2) durch Zugabe von einem 50-fachen Überschuß an unmarkiertem, spezifischem Oligonukleotid kompetiert werden (Spur 3). Die gleiche Menge an unspezifischem Kompetitor (Spur 4) hat keinen Einfluß auf die Komplexbildung, denn beide Komplexe sind unverändert vorhanden. Das Laufverhalten des ungebundenen, markierten Oligos ist in Spur 1 dargestellt. Diese Ergebnisse zeigen, daß die NCI-H661 Zellen nicht nur auf Transkript-Ebene positiv für GLI3 sind, sondern das sie ebenfalls das Protein enthalten müssen, welches mit der *GLI*-Konsensussequenz interagieren kann.

Nachdem diese Zelllinie nachweislich sowohl die mRNA für GLI3 als auch für GLI1 enthält, sollte mit dem spezifischen Antikörper die Identität des Proteins aufgedeckt werden. Der spezifische Nachweis des GLI3-Proteins ist in den Spuren 6 bis 9 dargestellt. Die Interaktion mit einem für den GLI3-N-Terminus (Spur 6 und 7) oder C-Terminus (Spur 8 und 9) spezifischen Antikörper führt zu einer erneut retardierten Bande, einem „supershift“. Während das α -GLI3 N-Terminus Antiserum in unaufgereinigter Form (Spur 6) und als reines IgG (Spur 7) sowohl den stärkeren, wie den schwachen Komplex retardierte, ist nur eine Interaktion des α -GLI3-C-Terminus Antiserums mit dem starken Komplex nachweisbar. Das Präimmunserum, in Spur 5 aufgetragen, wel-

ches keine GLI3-spezifischen Antikörper enthält, erzeugt keine erneute Retardierung (supershift) der DNA-Proteinkomplexe. Dies ist ein Beweis für die Spezifität der Antikörperbindung, die in den Spuren 6-9 dargestellt wurde.

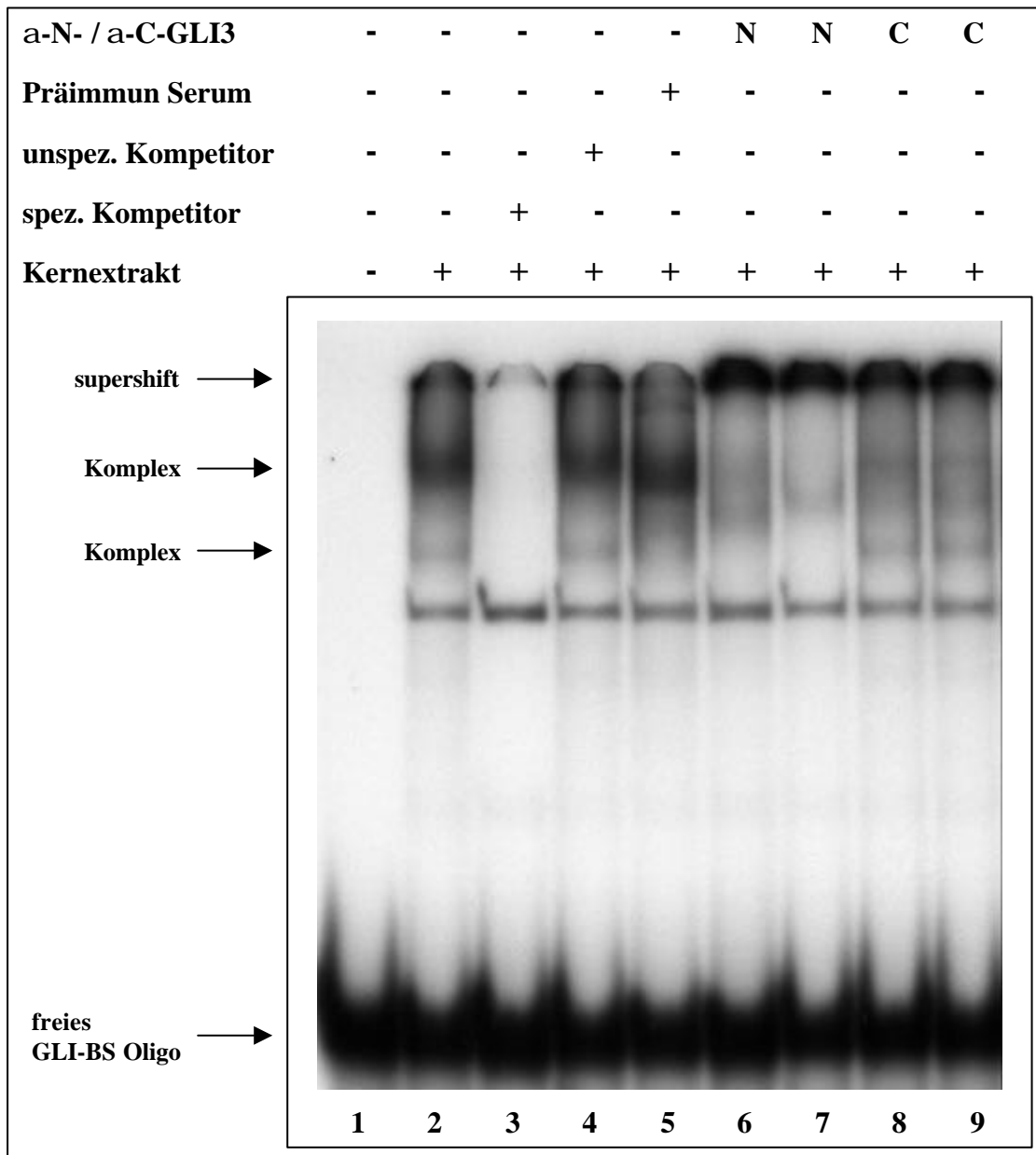


Abb. 13: Gelretardierungsexperiment mit endogenem GLI3-Protein. Kernextrakte von GLI3-positiven NCI-H661 Zellen wurden nach Andrew und Faller, 1991 präpariert. 24 µg Gesamtprotein wurden auf einem 6%igen Acrylamid-Gel in 0,5X TBE nach Inkubation wie angegeben (Kapitel 2.4.8.2) aufgetrennt. Spur 1 enthält nur das markierte GLI-Bindungsstellen (BS) Oligonukleotid. Die Spezifität der Bindungsreaktion wird über Konkurrenz mit einem spezifischen (Spur 3) oder unspezifischen Kompetitor (Spur 4) gezeigt. Die unterste, starke Bande zeigt jeweils das ungebundene, markierte GLI-BS Oligo, während die beiden mit "Komplex" bezeichneten Banden aus der retardierten Mobilität der proteingebundenen Doppelstrang-DNAs resultieren

(Spuren 2, 4 und 5). Die Inkubation mit den GLI3-spezifischen Antikörpern führt zu einer zusätzlichen Retardierung im Laufverhalten der spezifischen Komplexe, einem „supershift“. In den Spuren 6 und 7 wird dies durch das α -N-GLI3-Serum bzw. dessen aufgereinigte IgG-Fraktion, in den Spuren 8 und 9 jeweils durch die IgG-Fraktion der C-Terminus-spezifischen Antiseren (Serum 071 und 072) bewirkt.

3.2.2 Bindungsstudien mit rekombinanten GLI3-Zinkfinger-Peptiden

Der Zinkfingerbereich von GLI3 wurde bakteriell exprimiert, um Bindungsstudien durchzuführen. Dazu war der gesamte Zinkfinger-kodierende Bereich des *GLI3*-Gens vorab über eine PCR-Klonierungsstrategie in den bakteriellen Expressionsvektor pQE9 eingebracht worden (Vortkamp *et al.*, 1995). Die durch IPTG induzierten Proteine waren in Einschlusskörperchen abgelagert und wurden nach der Methode von Kadonaga *et al.*, 1987 aufgereinigt. In Abbildung 14 ist der klonierte Bereich, der das Zinkfingerpeptid bildet, schematisch dargestellt.

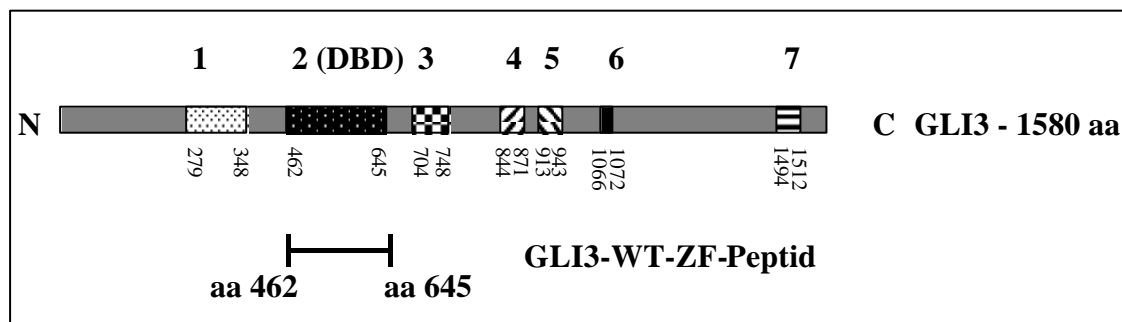


Abb. 14: Schematische Darstellung des GLI3-cDNA-Bereiches, der für das Wildtyp (WT)-Zinkfinger (ZF)-Peptid kodiert. Er umfaßt die gesamte DNA-bindende Domäne (DBD) von Aminosäureposition (aa) 462 bis 645 und wurde in den Expressionsvektor pQE9 überführt.

3.2.2.1 Mutationen im Zinkfingerbereich können die DNA-Bindungs-fähigkeit des GLI3-ZF-Peptids beeinflussen

Das in 3.2.2 beschriebene rekombinante Zinkfingerpeptid wurde eingesetzt, um die Auswirkungen von Zinkfingermutanten, die vor Ort über Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) als Missense-Mutationen im Polydaktylie-Patientenkollektiv detektiert

worden waren, auf das Bindungsverhalten des Zinkfingerpeptides zu testen. Die Lage der analysierten Mutationen ist in Abbildung 15 zusammengefaßt.

Bei der Mutation C520Y handelt es sich um einen Einzelbasenaustausch an der Nukleotidposition 1558 der cDNA von GLI3. Sie führt zu einem Aminosäurewechsel an Position 520 von Cystein (C) zu Tyrosin (Y) und betrifft den zweiten Cysteinrest des zweiten Zinkfingers. Diese während der Evolution hoch konservierte Aminosäure, ist an der Ausbildung des Fingers beteiligt. Wie in Abbildung 16 Mitte dargestellt, bewirkt eine Mutation an dieser Position die Zerstörung der DNA-Bindungsfähigkeit des Zinkfingerpeptides, denn es kommt zu keiner Protein-DNA-Komplexbildung. Die nicht vorhandene Interaktion wird auch durch Zugabe von Kompetitoren nicht beeinflußt. Der Einzelbasenaustausch von T zu G an einer ähnlich konservierten Stelle, in der Nähe der oben genannten Veränderung, führt zu dem Aminosäureaustausch C515G. Hier ist der erste Cysteinrest (C) des zweiten Zinkfingers betroffen und auch in diesem Fall war das Protein nicht mehr in der Lage, spezifisch mit dem markierten GLI3-BS-Oligonukleotid zu interagieren. Es fand keine Komplexbildung statt (Daten nicht gezeigt). Das in Abbildung 16 rechts dargestellte Gelretardierungsexperiment wurde mit einem Zinkfingerpeptid durchgeführt, bei dem der Basenaustausch von G zu C an der Stelle 1393 der GLI3-cDNA zu einem Austausch von Glycin (G) nach Arginin (R) an der Aminosäureposition 465 führt. Diese Variation, am Anfang der DNA-bindenden Domäne, betrifft nicht direkt einen Zinkfinger oder eine hoch konservierte Aminosäure, wodurch sich die unveränderte DNA-Bindungsfähigkeit des Peptids, vergleichbar mit der des Wildtyps (Abbildung 16 links), erklären läßt. Der entstehende Komplex ist in diesem Fall in gleicher Weise empfindlich gegen den spezifischen Kompetitor, wie der Wildtyp.

Eine weitere, über gerichtete Mutagenese eingeführte G zu A Basenveränderung der cDNA-Sequenz an Position 1874 wurde im Bindungsverhalten des Zinkfinger-Peptids getestet. Die Aminosäuresubstitution des Argininrestes (R) an Stelle 625 durch Glutamin (Q) befindet sich im sogenannten C-H-Link (siehe Abbildung 15) des fünften und damit letzten Zinkfingers. Obwohl dieser Austausch einen der Zinkfinger und eine hoch konservierte Aminosäureposition betrifft, zeigt sich keine Beeinflussung der DNA-Bindungsfähigkeit. Selbst die Titration mit spezifischem Kompetitor in kleinen Schritten bis zu einer Konzentration von 400-fachem Überschuß, zeigte keinen Unterschied im Bindungsverhalten zwischen dem Wildtyp- und dem an Position 625 mutierten Zinkfingerpeptid (Abbildung 17).

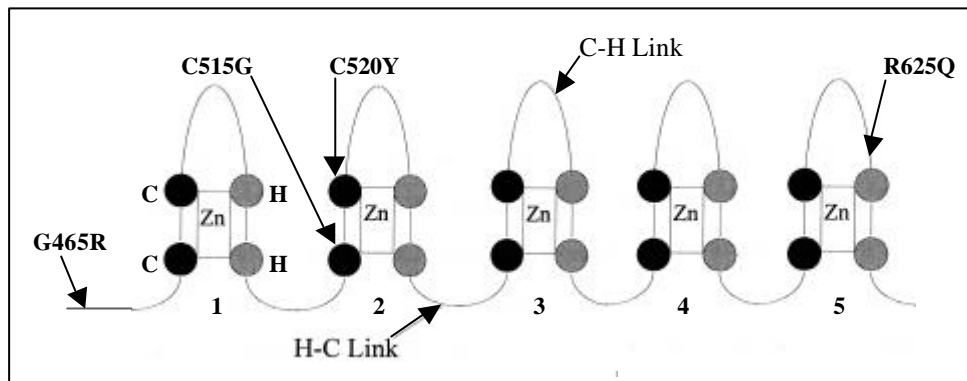


Abb. 15: Schematische Darstellung der C_2H_2 -Zinkfingerregion von GLI3. Die fünf einzelnen Zinkfinger sind durch Numerierung kenntlich gemacht. Die an der Fingerbildung beteiligten Cysteinreste werden mit schwarzen und die Histidinreste mit grauen Kreisen dargestellt. Alle im Abschnitt 3.2.2.1 erwähnten Mutationen, die direkt die Zinkfinger betreffen, sind entsprechend ihrer Position hier eingezeichnet.

Abb. 16: (Seite 104) Gelretardierungsexperiment mit rekombinanten Zinkfingerpeptiden. Die bakteriell exprimierten Peptide wurden, wie in Kapitel 2.4.6 beschrieben, präpariert und anschließend für die Gelretardierungsexperimente eingesetzt. Markiertes GLI-BS Doppelstrangoligonukleotid wurde mit gleichen Mengen (150 ng) Wildtyp-(WT), oder mutiertem Zinkfingerpeptid, nach vorheriger Zugabe zunehmender Mengen eines unmarkierten, spezifischen bzw. unspezifischen Kompetitors, inkubiert. Die untere Bande repräsentiert in allen Abbildungen das markierte, ungebundene GLI-BS Oligonukleotid, während die obere Bande aus dem retardierten Laufverhalten der proteingebundenen DNA resultiert. Die Komplexbildung zwischen den Zinkfingerpeptiden (WT-GLI3-Zinkfingerpeptid, links; die GLI3-ZF C520Y Mutante, Mitte und die GLI3-ZF G465R Mutante, rechts) ist unter den angegebenen Kompletionsbedingungen nach Auftrennung in einem 6%igen Gel mit 0,5X TBE durch eine native PAGE dargestellt.

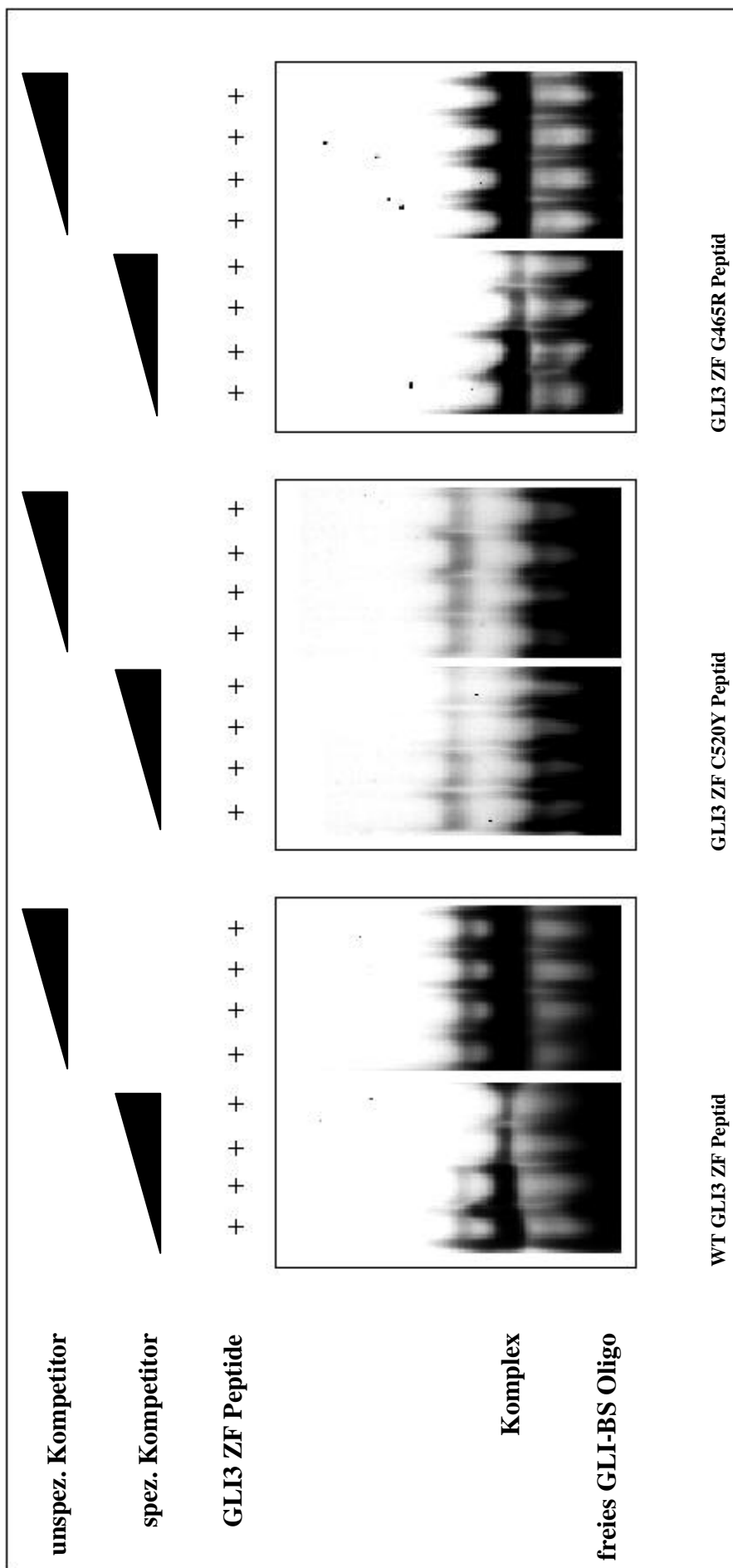


Abb. 16

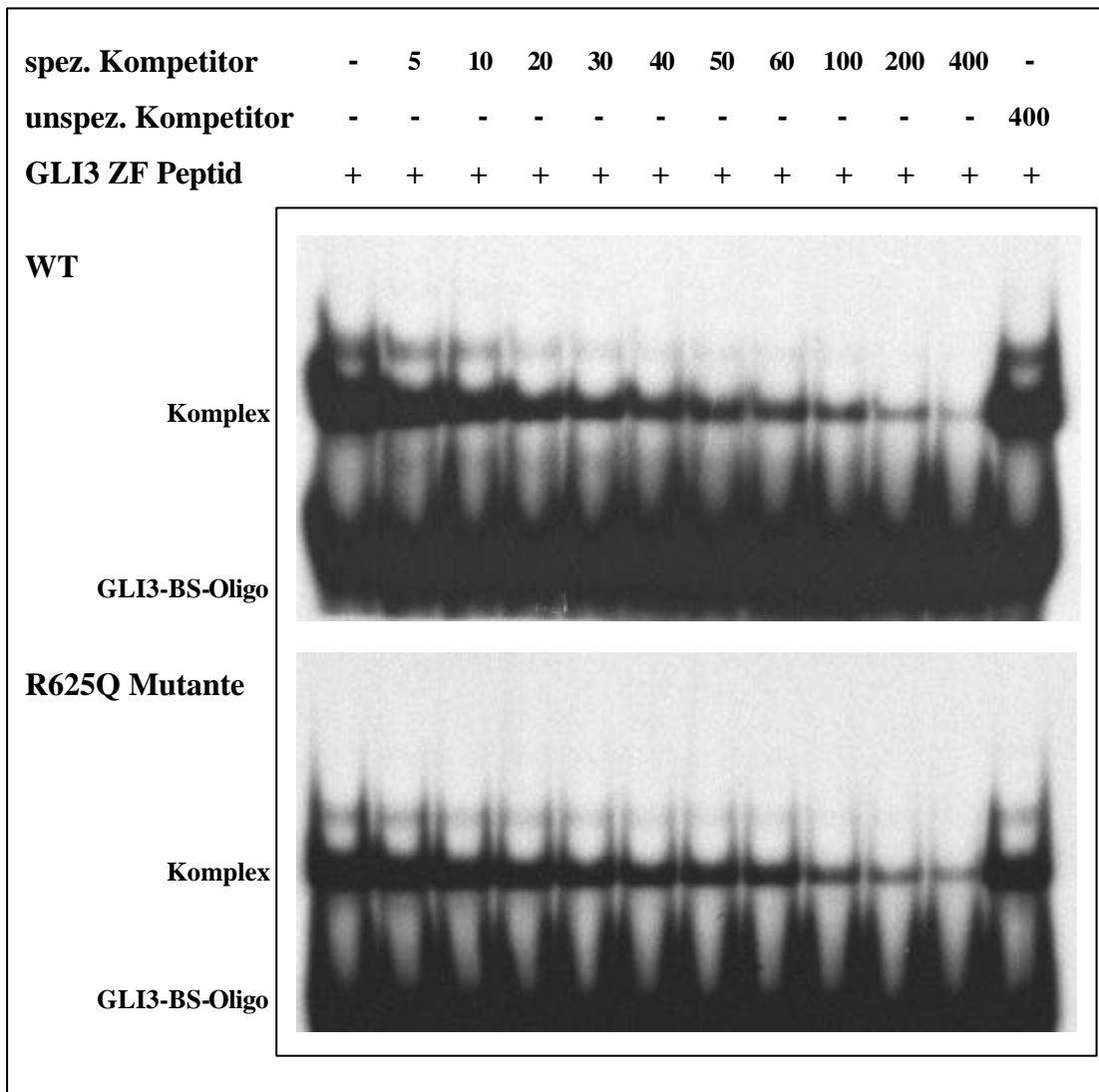


Abb. 17: Konkurrenzexperimente mit dem Wildtyp- und die Mutation R625Q tragenden Zinkfingerpeptid. Gelretardierungsexperimente mit bakteriell exprimierten Peptiden wurden, wie in Kapitel 2.4.8.2 beschrieben durchgeführt. Um die Affinität des WT-Peptids (oben) mit dem mutierten ZF-Peptid für die GLI3-Erkennungssequenz zu vergleichen, wurde die Zugabe des spezifischen Kompetitors von einem 5-fachen auf einen 400-fachen Überschuss gesteigert. Wildtyp und mutiertes Peptid zeigen dabei einen vergleichbaren Rückgang der detektierbaren Komplexbildung. In der letzten Spur ist die Bindungsreaktion in Anwesenheit eines 400-fachen Überschusses an unspezifischem Kompetitor gezeigt.

3.3 Einfluß von Mutationen in GLI3 auf die Fähigkeit dieses TF zur Aktivierung und Repression von Genen

Die transkriptionelle Aktivität von GLI3 wurde bereits in früheren Experimenten getestet (Kalf-Suske *et al.*, 1999). Dafür wurden GAL4-GLI3-Fusionskonstrukte generiert, die definierte Regionen des GLI3-Proteins an die DNA-bindende Domäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 gekoppelt enthalten. Zwei dieser Expressionsplasmide waren der Ausgangspunkt, um eine bei einem Greig-Patienten detektierte Mutation zu testen.

Neben dem GAL4-System, bei dem die Wirkung von GLI3 über die DNA-bindende Domäne eines Fremdproteins detektiert wird, kann die über eine GLI3-spezifische Erkennungssequenz vermittelte transkriptionelle Aktivität getestet werden. Die Erkennungssequenz liegt in Form einer artifiziellen Bindungsstelle vor, bei der die spezifische Konsensussequenz ein- oder mehrmals vor einen Minimalpromotor, der wiederum ein sogenanntes Reporter-gen steuert, vorgeschaltet ist. Dessen Transkriptionsrate wird also über die Interaktion des Transkriptionsfaktorproteins an seiner Erkennungssequenz gesteuert. Darüber hinaus ist es aber ebenso möglich, die 5' regulatorische Region eines bekannten Zielgens in ein Reporter-genkonstrukt einzubringen und damit die transkriptionelle Aktivität des DNA-bindenden Faktors an einem natürlich vorkommenden Template zu untersuchen.

3.3.1 Transaktivierende Wirkung von TA₁ in einem GAL4-Fusionsprotein wird nicht durch die Mutation S1526G beeinflusst

Eine sehr weit im C-Terminus gelegene Missense-Mutation, deren Aminosäureaustausch innerhalb einer der zwei unabhängigen GLI3-Transaktivierungsdomänen liegt (TA₁ und TA₂, Kalf-Suske *et al.*, 1999), sollte auf mögliche Auswirkung auf die Transaktivierung getestet werden. In zwei der GAL4-GLI3-Fusionskonstrukte konnte über die gerichtete *in vitro* Mutagenese ein Basenaustausch von A zu G an der Position 4576 eingeführt werden. Diese Sequenzänderung hat einen Aminosäureaustausch von Serin (S) nach Glycin (G) an der Stelle 1526 im Protein zur Folge. Sie liegt damit 16 Aminosäuren weiter C-terminal von Domäne 7, die das Potential zur Ausbildung einer amphi-

patischen Helix, einer klassischen Transaktivierungsdomäne, trägt und wahrscheinlich das kritische Motiv innerhalb der TA₁ bildet (TA₁ und TA₂; Kalff-Suske *et al.*, 1999). In transienten Transfektionsexperimenten wurden Fusionsexpressionskonstrukte mit der Wildtyp- oder der mutierten Sequenz mittels Lipofektin in GLI3-mRNA-positive (NCI-H661) als auch -negative Zelllinien (NCI-H441) eingeführt. Die Reportergenaktivität wurde hinsichtlich der Transfektionseffizienz normalisiert und über Luciferasemessung bestimmt. Die eingefügte Mutation zeigte weder einen Einfluß auf die Transaktivierung durch die TA₁ allein, noch auf die additive Wirkung der Domänen TA₁ und TA₂. In Abbildung 18 ist die Aktivierungsfähigkeit der einzelnen Konstrukte exemplarisch in der Zelllinie NCI-H441 dargestellt. Die Ergebnisse der Experimente in den GLI3-mRNA-positiven Zellen (NCI-H661) erbrachte ein vergleichbares Ergebnis.

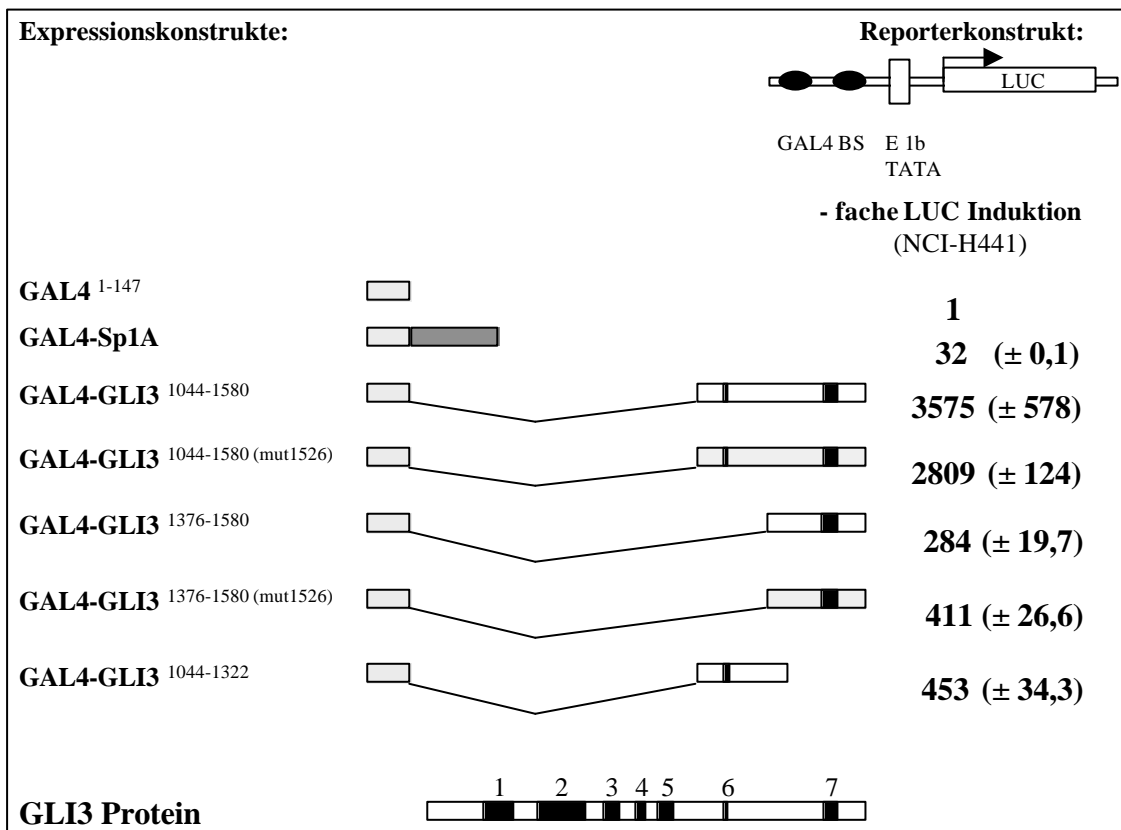


Abb. 18: Vergleich des Transaktivierungspotentials von GLI3-Wildtyp und S1526G Mutante.

NCI-H441 Zellen wurden Lipofektin vermittelt, transient mit 1 µg Reportergenkonstrukt G5E1bLUC, mit je 0,1 µg des entsprechenden GAL4-GLI3-Expressionsplasmids und 25 ng Kontrollvektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Firefly Luciferase in den Zellslysaten analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit Hilfe der internen Kontrolle der Transfektionseffizienz, gemessen über die *Renilla* Luciferase, korrigiert. Die Resultate sind als Vielfache der Aktivierungsfähigkeit von GAL4¹⁻¹⁴⁷, dem willkürlich der Wert von 1 zugewie-

sen wurde, dargestellt. Die schematische Repräsentation des GLI3-Proteins im unteren Teil der Abbildung zeigt, welche der Domänen von GLI3 an GAL4 fusioniert wurden. GAL4-Sp1A und GAL4-GLI3¹⁰⁴⁴⁻¹³²² wurden als zusätzliche Positivkontrollen mitgeführt. Die Resultate sind über mindestens zwei unabhängige Experimente, jeweils im Doppelansatz verifiziert. Die Standardabweichung ist jeweils in Klammern angegeben.

3.3.2 Einfluß des Wildtypproteins und ausgewählter GLI3- Mutanten auf die Transkription eines Reporters mit artifiziellen GLI-Bindungsstellen

Um Eigenschaften des vollständigen GLI3-Proteins zu bestimmen und innerhalb der *GLI*-Genfamilie zu vergleichen, wurden für eukaryontischen Gentransfer geeignete Expressionsvektoren generiert. Die vollständigen kodierenden Bereiche einschließlich der jeweiligen Kosaksequenzen von GLI1 und GLI3 (GLI1-cDNA; Kinzler *et al.*, 1988 und GLI3-cDNA; Ruppert *et al.*, 1990) wurden stromabwärts des heterologen CMV Promotors in die Vektoren pEGFP-N1 bzw. pEGFP-C1 kloniert, denen vorab das GFP entnommen worden war. Neben dem vollständigen Wildtyp-Protein, sollten gleichzeitig auch verschiedene *GLI3*-Gen-Mutationen, nicht trunkierende sowie trunkierende getestet werden. Dabei diene das komplette *GLI3* im Expressionsvektor, oder, falls aus klonierungstechnischen Gründen erforderlich, andere Plasmide als Ausgangspunkt für die durchzuführenden Mutagenesen. Die genauen Angaben zur Klonierung und zur *in vitro* Mutagenese sind in der Tabelle 2, Abschnitt 2.1.5 und in Tabelle 3c, Abschnitt 2.1.6 zusammengefaßt. Primär wurde die von Wildtyp- und Mutanten-GLI-Proteinen vermittelte Reporterogenaktivität bestimmt. Als Reporter diene ein Luciferasegen unter der Kontrolle von 8 Tandemkopien der Wildtyp-GLI-Konsensusbindungsstelle (8X3'GLI-BS LUC) bzw. unter der Kontrolle von 8 zerstörten Tandemkopien dieser Bindungsstelle (8X3'mGLI-BS LUC) und dem basalen Promotor des Huhn- δ -Crystallin Gens. Steigende Mengen an Expressionsplasmiden wurden mit Reporterkonstrukt (1,5 μ g) und internem Kontrollvektor (20 ng), zur Ermittlung der Transfektionseffizienz, kotransfiziert. Die eingesetzte Gesamtkonzentration an DNA betrug 2,5 μ g, wobei die variierenden Mengen an eingesetzten Expressionskonstrukten durch Ausgleichs-DNA ergänzt wurde. Die Anzahl der Promotorbindungsstellen wie auch die verwendete DNA-Gesamtmenge waren konstant. In der Regel wurden mindestens zwei unabhängige Transfektionen in Doppelansätzen durchgeführt, die 24 h bzw. 48 h nach Transfektion zur Reportergenbestimmung herangezogen wurden. Nach diesem Versuchsaufbau wur-

den verschiedene Zelllinien getestet. Abgesehen von intrinsischen Schwankungen, wie beispielsweise Transfektionseffizienz, oder auch die absolute Reporteraktivierung, ergaben die Daten in ihrer Aussage identische Ergebnisse.

Wie in Abbildung 19 dargestellt, wurde das Transaktivierungspotential der vollständigen GLI1- und GLI3-Proteine ermittelt. Dabei wurde die von Wildtyp- und Mutant-GLI3-Bindungsstellen gesteuerte Reporteraktivität gemessen. GLI1 zeigt eine konzentrationsabhängige Aktivierung des Reportergenkonstruktes. Diese muß über die GLI3-Bindungsstellen erfolgen, da die Reporteraktivität unter der Kontrolle von mutierten Erkennungssequenzen völlig zusammenbricht. Im Gegensatz zum GLI1-Protein, zeigt das GLI3-Protein keine Wirkung auf die Aktivität des getesteten Reporters in NCI-H441 Zellen, die kein endogenes GLI3 enthalten. Der deutliche Unterschied in der Transkriptionsrate des Reportergens nach Transfektion von GLI1 oder GLI3 wird auch in der Osteosarcoma Zelllinie U2-OS, die bereits endogen die GLI-Proteine exprimiert, beobachtet (Abb.20b). Die Aktivierung durch GLI1 ist konzentrationsabhängig in Anwesenheit von endogenem GLI1 und erreicht erst Sättigung bei der Transfektion von großen Mengen GLI1-Expressionsplasmid (1000 ng). GLI3 hingegen bleibt unabhängig von den Konzentrationen transkriptionell inaktiv.

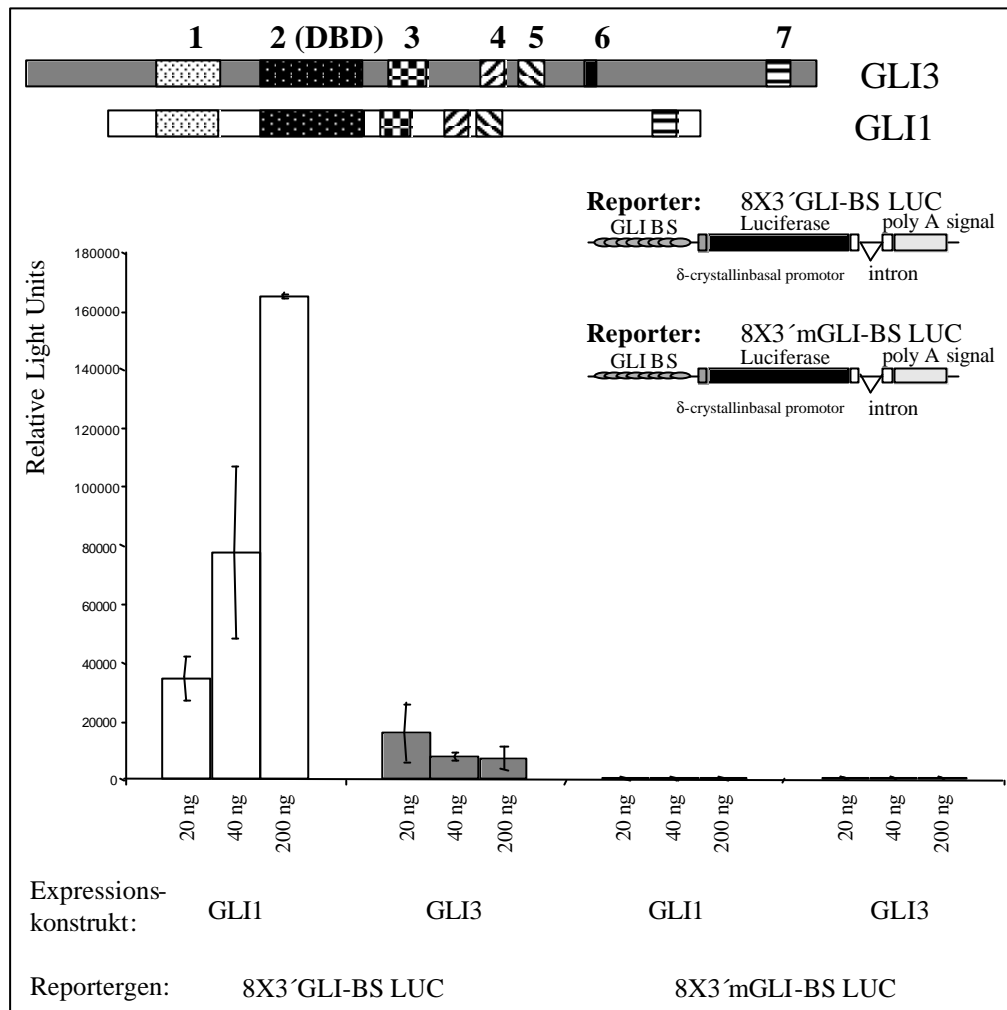


Abb. 19: Wirkung von in NCI-H441 transient exprimiertem GLI1 und GLI3 auf einen Reporter mit 8 facher GLI-BS und mutierter 8fach GLI-BS. Neben der schematischen Darstellung der Expressionskonstrukte im oberen Teil der Abbildung findet sich im unter Bereich das Säulendiagramm zur Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration der transfizierten DNA-Menge. Die weißen Aktivitätssäulen repräsentieren die Werte für GLI1, die grauen die für GLI3 und seine Mutanten. Die Standardabweichungen sind entsprechend eingetragen. Eine graphische Darstellung der Reporterkonstrukte findet sich am rechten Rand. Eine Kofransfektion von GLI1- oder GLI3-Expressionskonstrukten und den Reporterplasmiden, die wie angegeben WT (8X3'GLI-BS LUC) bzw. mutierte (8X3'mGLI-BS LUC) GLI-Bindungsstellen enthalten, wurde in NCI-H441 Zellen durchgeführt. 24 h später wurde die Reporteragenaktivität detektiert. Die ermittelten Luciferasewerte sind bezüglich der Transfektionseffizienz korrigiert und entstammen aus Doppelbestimmungen mindestens zweier unabhängiger Experimente.

Bei einigen Mutationen, die zum GCPS Syndrom führen, liegt die Veränderung in Domänen von GLI3, denen noch keine putative Funktion zugeordnet werden konnte (Abbildung 20a). Zur Eingrenzung der möglichen funktionellen Bedeutung der Veränderungen wurde ihr Verhalten, wie in Abbildung 20c dargestellt, im Kofransfektions-

system untersucht. Bei den betreffenden Missense-Mutanten handelt es sich um einen Aminosäureaustausch von Glycin (G) zu Arginin (R) an Position 727 der Polypeptidkette bzw. um die Deletion eines einzelnen Aminosäurerestes Glutamin (Q) an Position 926. In diesen beiden Fällen, sowie in der mitgeführten Kontrolltransfektion einer GLI3-Zinkfingermutante, C515G, ist kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Luciferaseaktivität zu verzeichnen. Das Fehlen einer aktivierenden Wirkung auf das Reportergen wird nicht durch die GLI3 Mutationen G727R und Q926del aufgehoben. Ob der N-Terminus des GLI3-Proteins einen Einfluß auf das Fehlen der aktivierenden Wirkung dieses Transkriptionsfaktors in diesem System ausübt, wurde durch die Transfektion eines GLI3-Expressionskonstruktes, dem diese Sequenzen fehlen (GLI3.ΔN) untersucht. Es konnte allerdings keine mit GLI1 vergleichbare Aktivierungswirkung nach Deletion der ersten 427 Aminosäuren des GLI3-Proteins beobachtet werden.

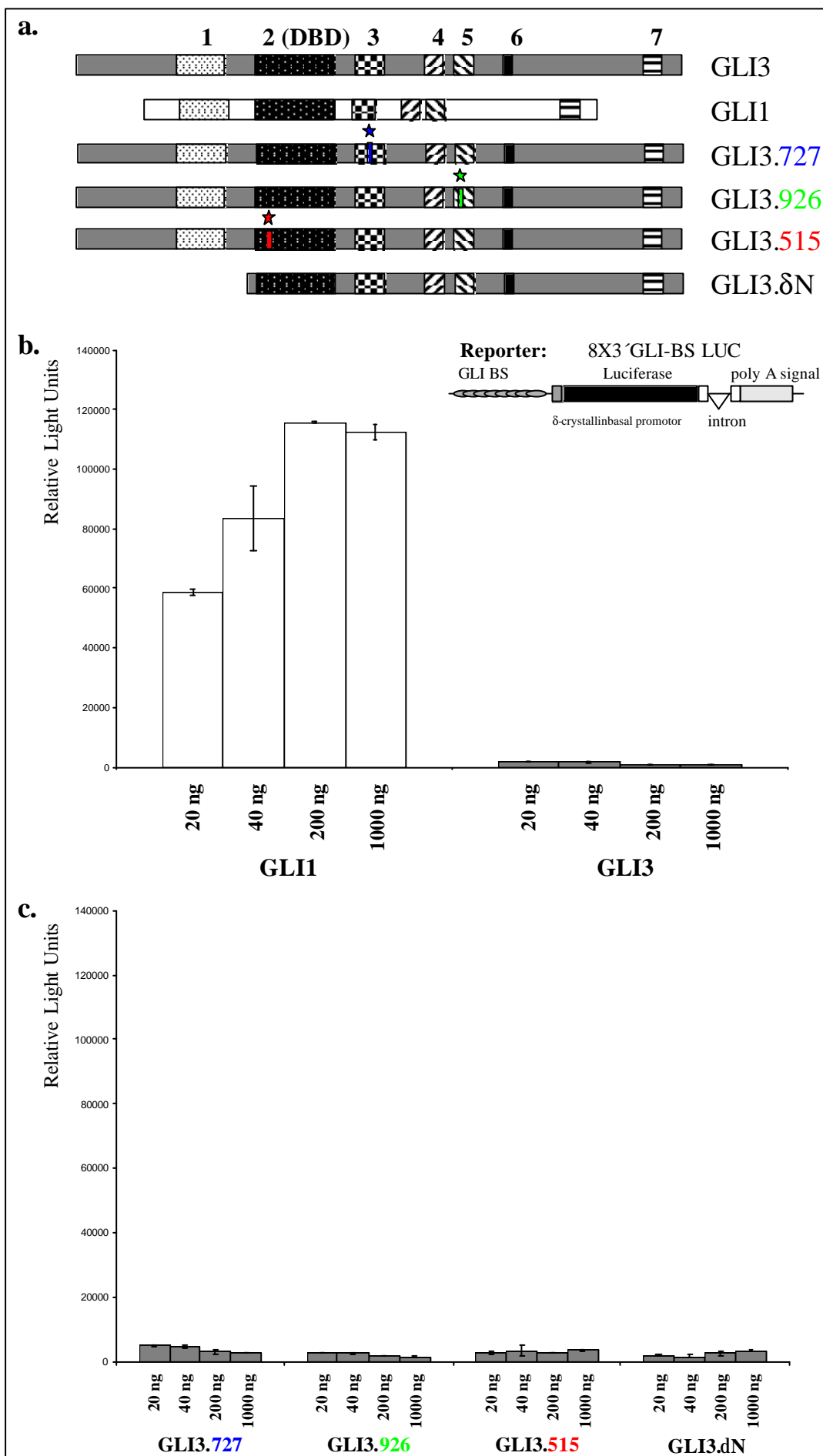


Abb. 20: Wirkung von GLI-Expressionskonstrukten in NCI-H441 auf ein Luciferasereporter-gen. In Teil a sind schematisch die verwendeten Expressionskonstrukte dargestellt. Die Symbole entsprechen denen, die in Abb. 9 beschrieben sind. DBD markiert die DNA-bindende Domäne und die eingeführten Mutationen sind an ihrer Position mit blauem, rotem bzw. grünem Stern gekennzeichnet. In Teil b und c ist die Reporter-genaktivierung mit „Relative Light Units“ (RLU) in Abhängigkeit von der Konzentration der transfizierten Expressionskonstrukte (Angabe in ng) dokumentiert. Die weißen Aktivitätssäulen repräsentieren die Werte für GLI1, die grauen die für GLI3 und seine Mutanten. Die Standardabweichungen der Doppelbestimmungen sind entsprechend eingetragen. Eine graphische Darstellung des Reporters findet sich am rechten Rand. Alle Resultate sind auch hier in Doppelbestimmungen, bei unabhängigen Experimenten erzielt worden.

3.3.3 Einfluß von GLI3-Mutanten auf die Konkurrenz von GLI1 und GLI3 um gleiche Reporter-genbindungsstellen

Wie im Kapitel zuvor gezeigt, ist das GLI3-Expressionskonstrukt, welches für das vollständige Protein kodiert, im Gegensatz zum GLI1-Konstrukt offensichtlich nicht in der Lage, unter den experimentellen Bedingungen die Reporter-genaktivität zu stimulieren. Da der Reporter aber GLI-Konsensusbindungsstellen enthält, sollte es beiden GLI-Proteinen zumindest möglich sein, mit den Bindungsstellen zu interagieren. GLI1 führt, unabhängig von der verwendeten Zelllinie, zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung des Reporter-gens, was eine eindeutige Interaktion mit den artifiziellen Bindungsstellen beweist. Um diese Interaktion auch für das GLI3-Protein zeigen zu können, wurden beiden GLI-Proteine zusammen transfiziert. Sind beide in der Lage auf das Reporter-gen zu wirken, so sollte es zwischen ihnen zu einer Konkurrenz um die Bindungsstellen kommen, deren Auswirkung mit Hilfe der Reporter-genaktivität detektiert werden kann. Bei dem durchgeführten Wettbewerbsassay wurden die experimentellen Bedingungen, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, gewählt, diesmal jedoch eine konstante Menge von GLI1-Expressionskonstrukt (200 ng) mit einer konstanten Menge der unterschiedlichen GLI3-Plasmide (GLI3, GLI3.727, GLI3.926, GLI3.515 und GLI3.ΔN; 800 ng) kotransfiziert. Nach 48h Inkubationszeit wurden die Zellen zur Reporter-genmessung lysiert. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse des Wettbewerbsansatzes zusammengefaßt. Die Kontrolltransfektion mit dem GLI1-Expressionsplasmid (200 ng) bewirkt wie in den vorangegangenen Experimenten eine hohe Luciferaseaktivität im Vergleich zum Leervektor. Die Kotransfektion mit GLI3 als Wildtyp, aber auch die Mutanten GLI3.727 bzw. GLI3.926 resultieren in einer deutlichen Repression der durch GLI1-

induzierten Reporterogenaktivität. Die detektierte Enzymaktivität der Luciferase von über 150.000 RLU (Relative Light Units) bei alleiniger Transfektion des GLI1-Expressionsplasmides, reduziert sich auf 50.000 RLU und weniger bei allen Kompetitionsansätzen. Die repressorische Wirkung vom unveränderten GLI3-Protein entspricht der der getesteten Sequenzvarianten GLI3.727 und GLI3.926, denn die Reporterogenaktivität geht bei allen kotransfizierten Konstrukten um mehr als zwei Drittel zurück (Abbildung 21a). Von der Repression der GLI1-Aktivität durch die GLI3-Mutanten Konstrukte kann man, wenn auch nur qualitativ, grundsätzlich deren Expression ableiten.

In Abbildung 21b ist der Transfektionsansatz von GLI1 allein, im Vergleich zu den Kotransfektionsansätzen mit GLI3-Wildtyp, der GLI3.δN- und der GLI3.515-Mutante dargestellt. Die durch die Interaktion von GLI1 mit den spezifischen Bindungsstellen des Reporters induzierte Enzymaktivität der Luciferase wird, wie bereits gezeigt, durch das unveränderte GLI3-Protein kompetiert. Aber das N-terminal um 427 Aminosäuren verkürzte GLI3-Protein ist nicht in der Lage, die GLI1-vermittelte Aktivität des Reporters zu reprimieren, während die Zinkfinger-Mutante an Position 515 der GLI3-Aminosäuresequenz offensichtlich eine leicht repressorische Wirkung ausübt, da die Luciferaseaktivität um annähernd 20% abnimmt. Vorausgesetzt die Zinkfinger-Mutante wird exprimiert, erlauben diese Beobachtungen den Schluß, daß die repressorische Aktivität des WT-GLI3-Proteins über die ZnF-Motive erfolgt, da sie von einer Zinkfinger-Mutante aufgehoben wird. Der Expressionsnachweis ist bestenfalls semiquantitativ. Die Unterschiede der für GLI1 allein ermittelten Luciferasewerte zwischen a. und b. lassen sich methodisch erklären.

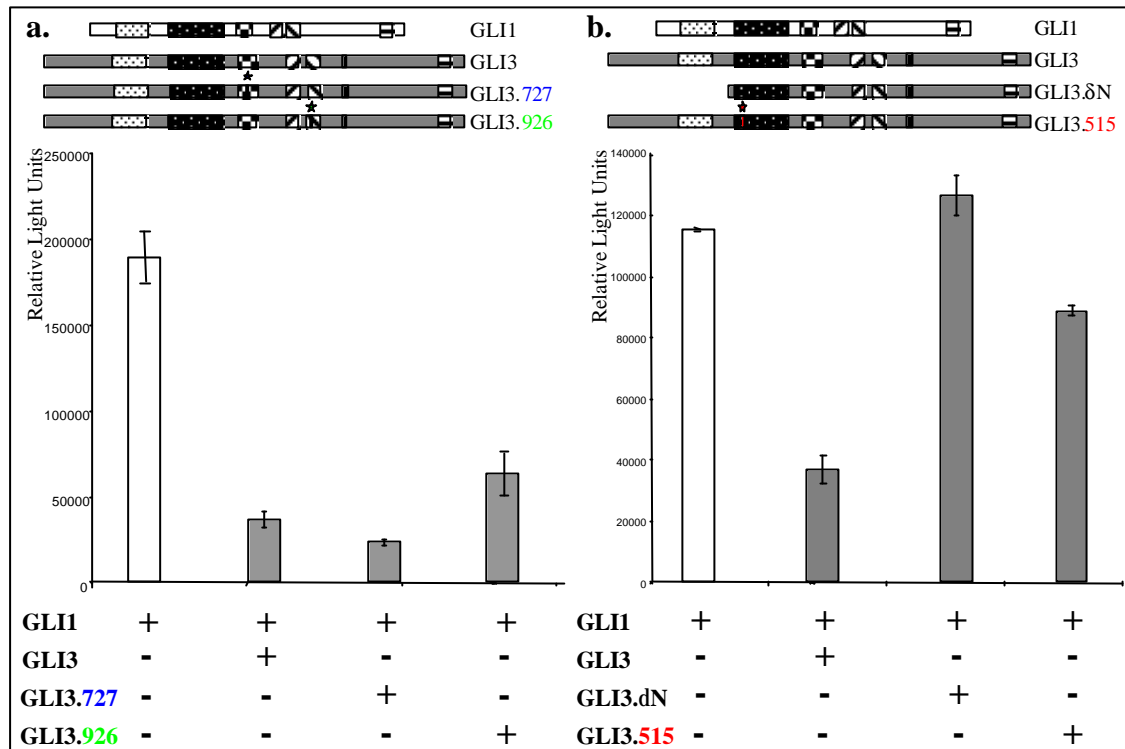


Abb. 21: Kompetitionsassays der GLI-Expressionskonstrukte in NCI-H441. Die in diesen Experimenten verwendeten Expressionsplasmide sind jeweils im oberen Teil der Abbildungen dargestellt. Die Wirkung der Expressionsplasmide nach Einzel- oder Kotransfektion wurde mit Hilfe des Reporters, der eine 8fache GLI-Bindungsstelle (8X3'GLI-BS LUC) enthält in der Osteosarkomazelllinie U2-OS getestet. Die GLI1-Einzeltransfektionen (200 ng) werden durch weiße, die Kotransfektionsansätze (200 ng GLI1 und 800 ng der unterschiedlichen GLI3-Varianten) durch graue Aktivitätssäulen repräsentiert. Die transfizierte Gesamtmenge an DNA war in allen Ansätzen konstant, gegebenenfalls durch den Einsatz von Ausgleichs-DNA. Die durch GLI1 bewirkte Reporterogenaktivierung wird sowohl über die Zugabe von GLI3-Wildtyp als auch über die Zugabe von in Position 727 oder 926 mutiertem GLI3 deutlich reprimiert. Das N terminale Deletionskonstrukt von GLI3 zeigt keinerlei reprimierende Wirkung auf die GLI1-vermittelte Enzymaktivierung, während der an Position 515 des Proteins eingefügte Aminosäureaustausch eine Repression von ca. 20% zeigt. Die ermittelte Reporterogenaktivität in Form der Luciferasewerte wurde bezüglich der Transfektionseffizienz mittels eines internen Kontrollvektors korrigiert. Die aufgeführten Resultate entstammen Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, deren Standardabweichung entsprechend markiert ist.

3.3.4 Konservierte Sequenzbereiche im Aminoterminus von GLI3 mit noch unbekannter Funktion

Die Beobachtungen bezüglich des N-terminalen Deletionskonstruktes von GLI3 (GFP-GLI3.ΔN) in diesen Transaktivierungsstudien machte deutlich, daß im Bereich zwischen

Zinkfingerdomäne und N-Terminus des Proteins noch mögliche Funktionen verborgen liegen können. Bei der genaueren Inspektion der N-terminalen Sequenzen von GLI3 und seinen Familienmitgliedern fielen konservierte Bereiche auf, die der Konsensussequenz für Sentrinization (*I/L*)**K**(*Q/T*)E entsprechen. Bei Sentrin-1 (SUMO-1) handelt es sich um einen Ubiquitin-ähnlichen Faktor, welcher Teil einer Proteinmodifikationskaskade ist, die sich deutlich von der des Ubiquitins unterscheidet (Boddy *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1996; Yeh *et al.*, 2000). Insgesamt sechs Motive, die der Konsensussequenz für Sentrinization mehr oder weniger entsprechen, befinden sich im N-Terminus bis hinein in den Zinkfingerbereich von GLI3. Der Konservierungsgrad dieser möglichen Modifikationsdomänen variiert zwischen den einzelnen GLI-Familienmitgliedern. Die ersten zwei dieser Bereiche liegen sehr weit N-terminal, einmal an der Aminosäureposition 15-17 (KVE) und bei 86-88 (KKE) der von Ruppert und Mitarbeitern 1990 veröffentlichten cDNA und Aminosäuresequenz. Das dritte Motiv an Position 462-464 (KEE) ist zwischen GLI3 und GLI2 konserviert, genauso wie das an letzter Stelle (aa 510-512; KKE) liegende. Die direkt zu Beginn des DNA-bindenden Bereiches gelegene Domäne 467-469 (KDE) ist nur in GLI3 vorhanden, während die fünfte Domäne an Position 471-473 (KQE) unter allen GLI-Familienmitgliedern konserviert ist. Wie in Abschnitt 3.3.3 gezeigt, führt die Deletion der ersten 427 N-terminal gelegenen Aminosäuren von GLI3, die die beiden ersten putativen Sentrinizationsstellen nicht enthalten, nicht zur Repression der GLI1-induzierten Reportergenaktivität. Diese beiden Modifikationsstellen, oder aber andere, in der deletierten Region befindliche funktionelle Domänen, können die Aufhebung der Repression bewirkt haben. Als nächstes fokussierte sich der Blick auf das dritte und vierte konservierte Motiv (aa 462-464 und aa 467-469), um den Einfluß der anderen Motive in bezug auf Aktivierung oder Repression durch GLI3 testen zu können. Dazu wurden die stark geladenen Aminosäuren der KEE- und KDE-Motive, über gerichtete *in vitro* Mutagenese durch Alanine ersetzt. Dabei entstanden jeweils Einzelmutanten (KEE zu AAA oder KDE zu AAA) und eine Doppelmutante, in der beide geladenen Bereiche verändert waren (KEE zu AAA und KDE zu AAA). Die genaue Strategie zur Mutagenisierung ist unter dem Kapitel 2.1.6, in der Tabelle 3c zusammengefaßt. Die generierten Expressionskonstrukte wurden in GLI3-mRNA positive (U2-OS Zellen) und GLI3-mRNA negative Zellen (NCI-H441) transient transfiziert und mit dem 8X3'GLI-BS LUC Reporter gen auf ihre Wirkung getestet. Dabei wurden steigende Mengen der mutierten GLI3-Konstrukte (GLI3.KEE, GLI3.KDE, GLI3.KEE+KDE) zugefügt. GLI1 und mutiertes GLI3 waren in konstanter Konzentra-

tion vorhanden. In Abbildung 22 sind die für die einzelnen Konstrukte ermittelten Reporteraktivitäten in NCI-H441 Zellen dargestellt. Die Analysen mit U2-OS Zellen erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Die konzentrationsabhängige Aktivierung des Reporters (8X3'GLI-BS LUC) durch die aktivierende Wirkung von GLI1 ist deutlich festzustellen, während auch hier die GLI3-Konstrukte allein keine Wirkung auf den Reporter haben. Der Kompetitionsansatz zeigt für die Einzelmutanten ebenfalls eine Reprimierung der GLI1-induzierten Aktivierung, vergleichbar der, die durch das GLI3-Wildtypprotein erzeugt wird. Die KEE+KDE Doppelmutante hingegen scheint GLI1 wesentlich stärker in seiner Wirkung zu hemmen, denn die ermittelten RLU-Werte liegen hier vier- bis zehnfach niedriger als bei der Competition durch die Einzelmutanten.

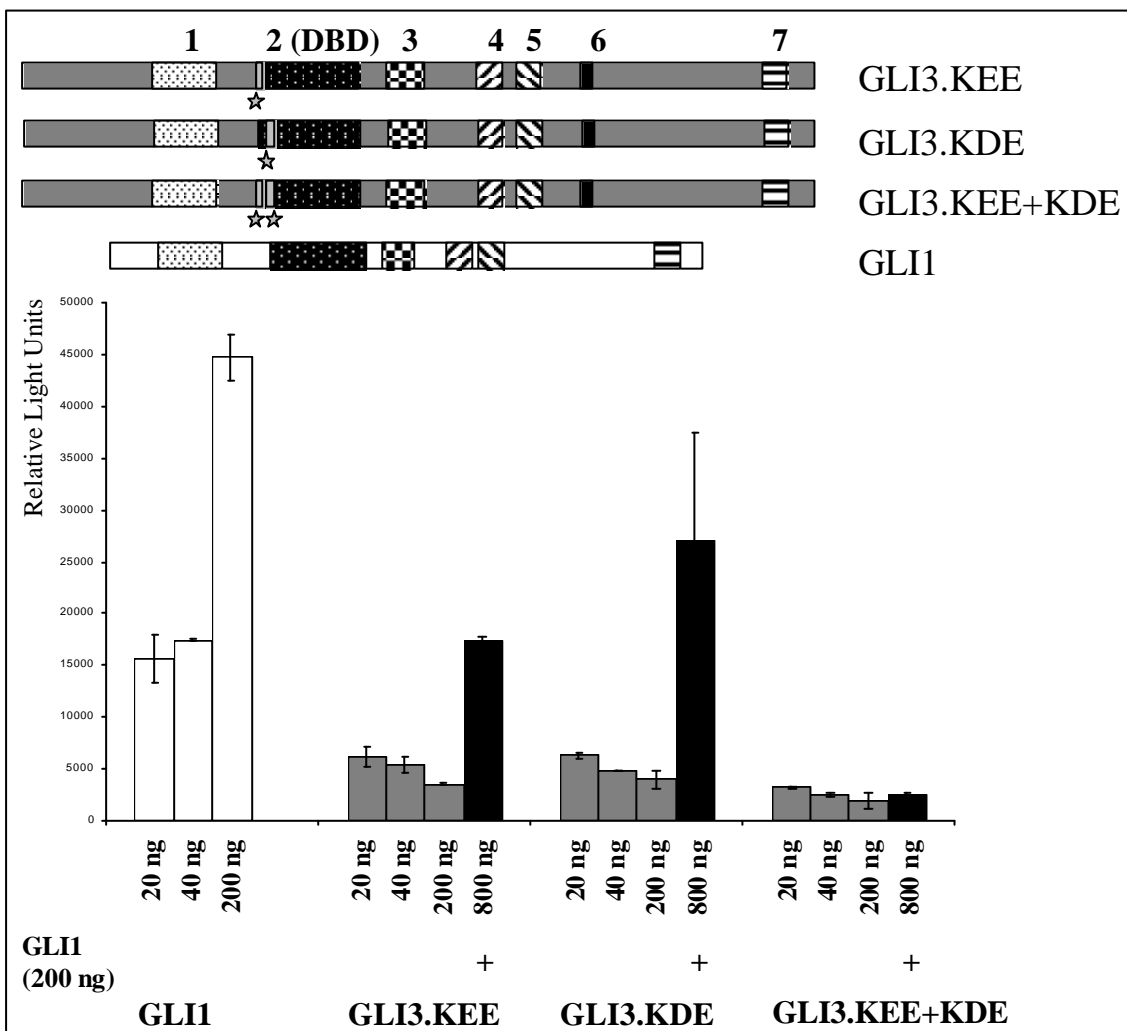


Abb. 22: Transaktivierende Aktivität der mutierten KEE- und KDE-Motive in GLI3-Expressionskonstrukten. NCI-H441 Zellen wurden sowohl mit steigenden Konzentrationen von GLI1- (weiße Aktivitätssäulen), als auch von mutierten GLI3-Expressionsplasmiden (dunkelgraue Aktivitätssäulen) transient transfiziert. Der Kompetitionsansatz für die drei mutierten

Expressionskonstrukte setzte sich zusammen aus 200 ng GLI1 und 800 ng GLI3 und wird jeweils durch die schwarzen Aktivitätssäulen repräsentiert. Die transfizierte DNA-Gesamtmenge entspricht immer 1 µg. Die Aktivierung des Reporters (8X3'GLI-BS LUC) wurde 24 h post Transfektion durch Lyse der Zellen und Messung der Luciferase detektiert. Die Luciferaseaktivität ist durch RLU (RelativeLight Units) gekennzeichnet und nach Korrektur bezüglich der Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von den transfizierten Konstrukten dargestellt. Die Ergebnisse wurden über Doppelbestimmungen in unabhängigen Experimenten ermittelt, wobei die jeweilige Standardabweichungen entsprechend eingezeichnet wurde.

3.3.5 Transaktivierende Wirkung von GLI3-Mutanten auf den natürlichen Promotor eines Zielgens

Die Transaktivierungsfähigkeit der GLI-Proteine wurde mit Reportergenkonstrukten getestet, welche artifizielle, multimerisierte GLI-Bindungssequenzen im Promotor besaßen (8 Tandemkopien der Wildtyp bzw. der mutierten GLI-Konsensusbindungsstelle). Um diese Fähigkeiten mit einem natürlichen Promotor zu testen, wurde die 4,3-kb 5' regulatorische Region des humanen *PTCH1* Gens, welche zwei konservierte GLI-BS-Konsensussequenzen enthält, in den pGL3-Basic Vektor kloniert (Kogermann *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1999). Sie stellte den vorgeschalteten Promotor für das Reportergen Luciferase dar. Es wurden Zelllinien, die entweder endogenes GLI3 enthalten (U2-OS), oder dieses Gen nicht exprimieren (NCI-H441) unter den bereits erwähnten Transfektionsbedingungen transient transfiziert. 24 h (NCI-H441) bzw. 48 h (U2-OS) nach der Transfektion, wurde die über das Reportergenkonstrukt (1,5 µg pPTCH1) und die Expressionsplasmide vermittelte Reportergenaktivität mit Hilfe des Dual Luciferase Assays detektiert. In Abbildung 23 sind die bei der Transfektion von U2-OS Zellen ermittelten Ergebnisse exemplarisch dargestellt. Die Zugabe steigender Mengen an GLI1-Expressionsvektor zeigte konzentrationsabhängig einen leichten Rückgang in der Luciferaseaktivität. Dies muß allerdings unter Beachtung der extrem niedrigen Luciferaseaktivität des, unter Kontrolle der pPTCH1 Sequenzen stehenden Reportergens gewertet werden. Dies wird deutlich aus dem Vergleich aller anderen verwendeten Expressionsplasmide, die entweder GLI3 Wildtyp oder mutierte GLI3 Formen enthielten, mit dem Leervektor (δ GFP; Expressionsplasmid ohne Insert), sowie den in Abbildung 21 erzielten Werten mit einem anderen Reportergen. Die Enzymaktivitäten unterscheiden sich untereinander durch intrinsische Schwankungen (bedingt durch Transfektionseffizienz). Der jeweilige Kompletionsansatz aus GLI1 (200 ng) und den verschiedenen

GLI3 (800 ng) Expressionsvektoren erzielte Luciferasewerte, die der alleinigen Transfektion von GLI1 vergleichbar sind. Das heißt, die ohnehin niedrige GLI1-Aktivität läßt sich nicht weiter, auch nicht durch GLI3-WT-Koexpression senken.

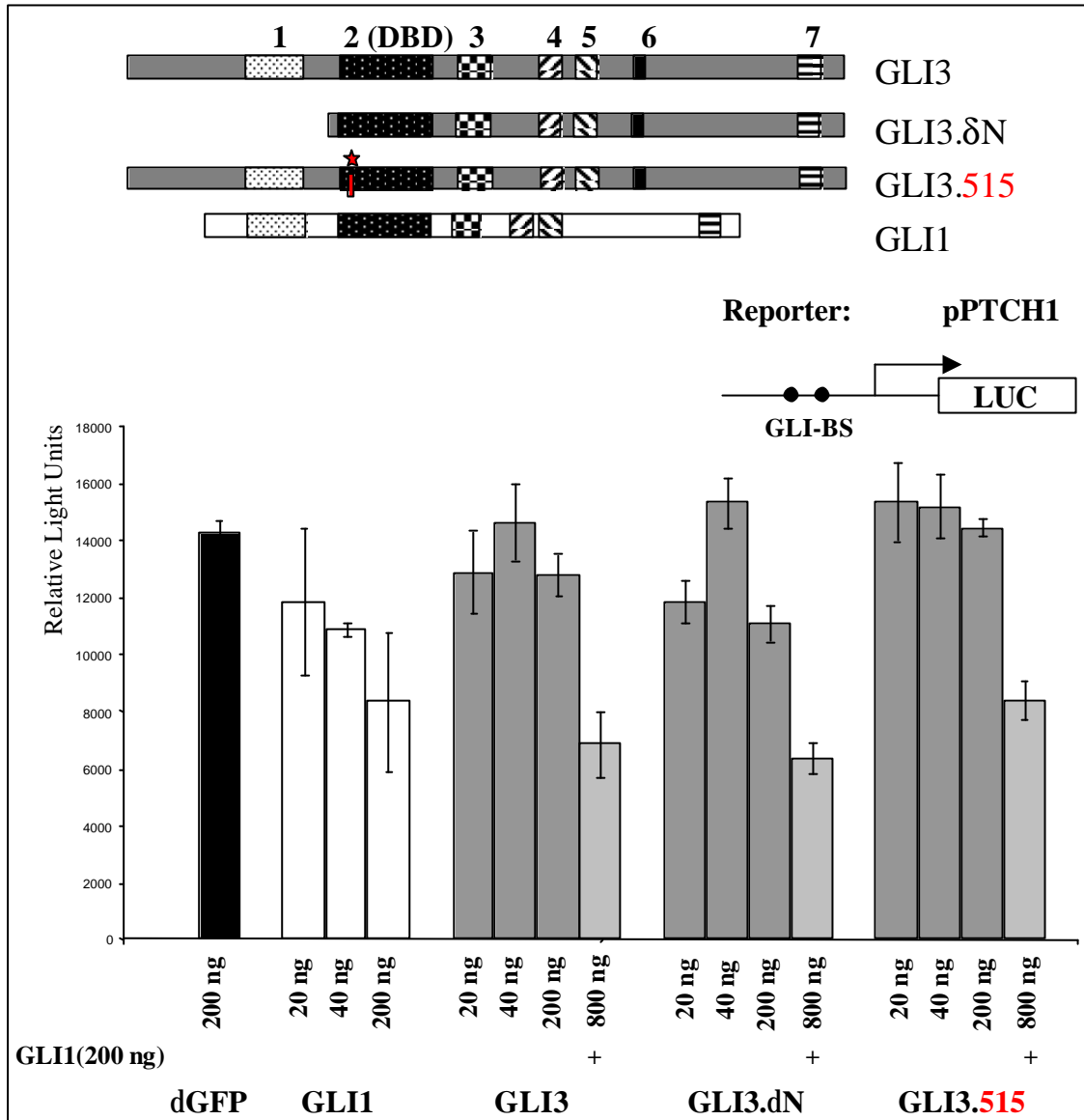


Abb. 23: Transaktivierende Wirkung der GLI-Proteine auf einen natürlichen Promotor. U2-OS Zellen wurden transient mit einem oder zwei Expressionskonstrukten transfiziert, wobei die verwendete Gesamt-DNA Menge über Einsatz von Ausgleichsplasmiden identisch blieb. Nach Zugabe von 1,5 µg Reporterplasmid (pPTCH1) und einer anschließenden Inkubation von 48 h, wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität in Form von RLU (Relative Light Units) detektiert. Die RLU sind in Abhängigkeit von den transfizierten Konstrukten dargestellt, wobei die in diesem Experiment verwendeten Expressionsplasmide im oberen Teil der Abbildung dargestellt sind. Die durch den Leervektor (dGFP; 200 ng) vermittelte Aktivität wird durch die schwarze Säule und die durch GLI1 erzeugte Enzymaktivität von weißen Säulen dargestellt. Die getesteten GLI3 Konstrukte werden von den dunkelgrauen, die Kompetitionsansätze von

den hellgrauen Aktivitätssäulen repräsentiert. Alle dargestellten Resultate wurden bezüglich der Transfektionseffizienz korrigiert und entstammen Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Ihre Standardabweichung ist entsprechend markiert.

3.4 Einfluß von GLI3-Deletionen auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins

Transkriptionsfaktoren (TF) haben den Ort ihrer Wirkungsstätte grundsätzlich im Zellkern, wo sich die DNA befindet, deren transkriptioneller Zustand moduliert werden soll. Dabei stellt sich die Frage, wie das TF-Protein dorthin gelangt, um den entsprechenden Einfluß auszuüben. GLI3, mit einem Molekulargewicht von 190 kDa, benötigt auf Grund seiner Größe einen aktiven Transport zur Passage der Kernmembran. Die beteiligten Transporter hierfür sind aber noch nicht bekannt. Um der Frage der zellulären Verteilung des GLI3-Proteins nachzugehen, wurden GLI3-GFP (Green Fluorescence Protein)-Fusionskonstrukte generiert, die ein Fusionsprotein liefern, dessen Aufenthaltsort über die Fluoreszenzeigenschaften des GFP *in vivo* und nach Fixierung ermittelt werden kann. Die generierten, GLI3-spezifischen Antikörper konnten nicht für den Nachweis von endogenem GLI3 in Zellen über Immunfluoreszenz eingesetzt werden.

3.4.1 N- und C-terminale GLI3-Deletionskonstrukte mit GFP

Das pEGFP-System besteht aus eukaryontischen Expressionsvektoren, die bereits die Sequenzinformation für das Green Fluorescence Protein (GFP) beinhalten. Wird das zu untersuchende Gen, *GLI3*, unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters, in diese Plasmide kloniert, so werden nach Transfektion in Wirtszellen Fusionsproteine aus GFP und GLI3 exprimiert. Diese sind nach einer gewissen Expressionszeit z.B. über ein Fluoreszenzmikroskop zu detektieren. Die entstehenden Proteine können zum einen N-terminale Fusionen (pEGFP-N) sein, wobei sich das zu untersuchende Gen vor der GFP-Sequenz befindet und zum anderen auch C-terminale (pEGFP-C). In diesem Fall wird das Zielgen hinter die GFP-Sequenzinformation geschaltet. Um einen möglichst exakten Überblick über die GLI3-Proteinverteilung zu gewinnen, wurden neben Konstrukten, die die gesamte *GLI3*-Sequenz enthielten, auch amino- und carboxyterminale Deletionen generiert. Sie sollten helfen, vermutete Funktionen, wie z.B. möglicherweise ein zytoplasmatisches Retentionsignal, bestimmten Domänen zuordnen zu können. An-

dererseits könnte die unterschiedliche Markierung des GLI3-Proteins bzw. der GLI3-Anteile in Zellsystemen möglicherweise an Hand differentieller Verteilung Hinweise auf die postulierte Spaltung des TF erbringen. Die Herstellung von N- und C-terminalen Fusionen mit gleicher *GLI3*-Sequenzinformation diene als interne Kontrolle, um gegebenenfalls störende Interaktionen zwischen dem N- bzw. C-terminal fusionierten GFP und dem GLI3-Anteil herausfiltern zu können. In Abbildung 24b sind die bestimmten Fusionen, die identifizierte Kettenabbruchmutationen nachahmen sollen, schematisch dargestellt. Ein Vergleich zum vollständigen GLI3-Protein (Abbildung 24a) zeigt die Lage der einzelnen, klonierten Bereiche an. Die genauen Klonierungsstrategien zu den Konstrukten sind in der Tabelle der Expressionsplasmide (Tabelle 2) im Abschnitt 2.1.5 zusammengestellt.

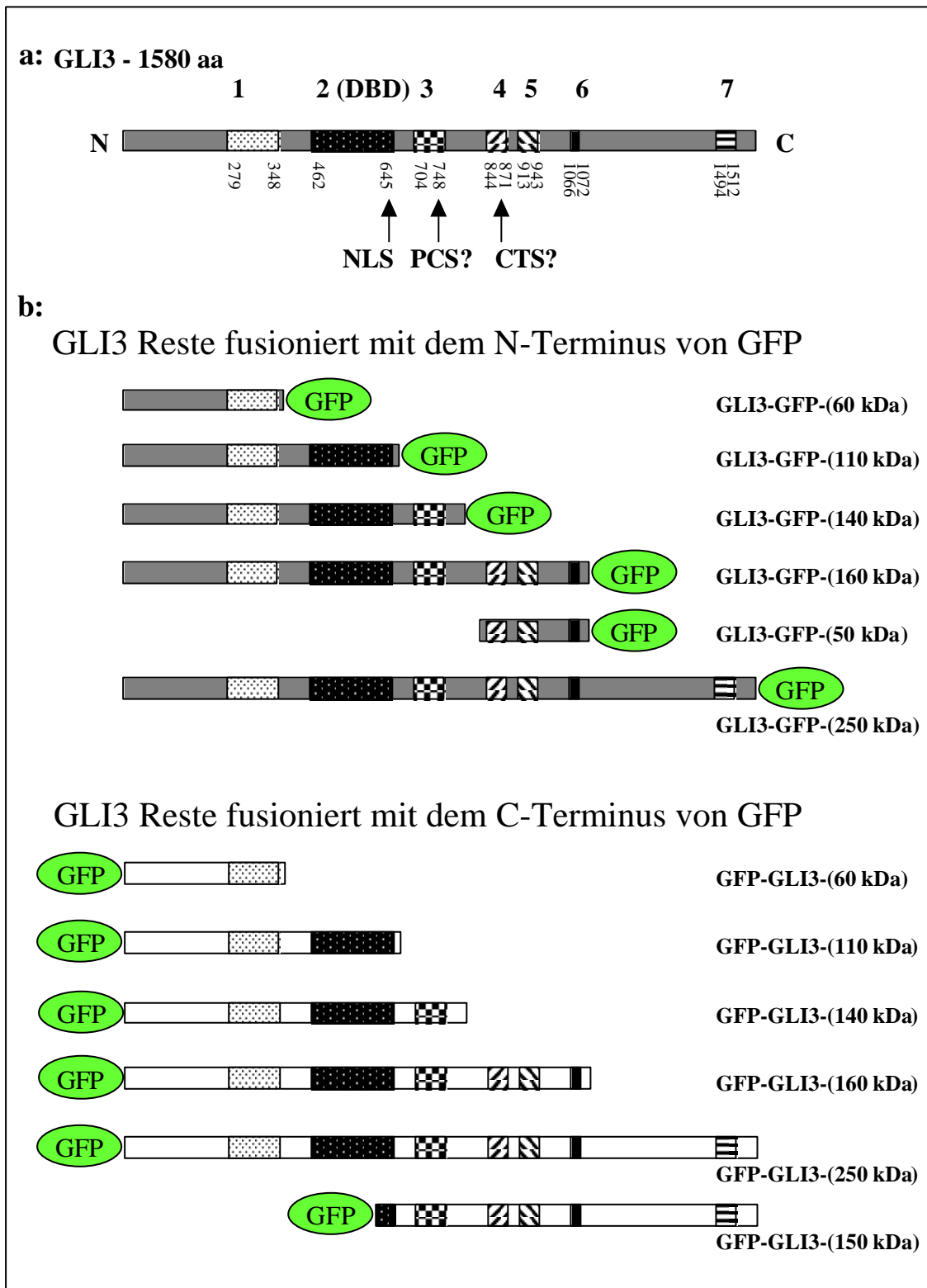


Abb. 24: Schematische Darstellung des gesamten GLI3- und der GLI3-GFP-Fusionsproteine. Im Abschnitt a sind die Homologiedomänen der GLI-Proteine mittels arabischer Zahlen und Boxen unterschiedlicher Struktur angegeben. Start und Ende dieser Regionen sind jeweils über die erste und letzte Aminosäure angezeigt. Region 2 enthält die DNA-bindende Domäne (DBD). Pfeile deuten die vermutete Proteinspaltstelle (PCS) bzw. ein zytoplasmatisches Retentionssignal (CTS) an. Im unteren Teil der Abbildung (b) sind die GLI3-GFP-Fusionsproteine darge-

stellt. Alle an den N-Terminus von GFP gekoppelten GLI3-Reste (GLI3-GFP) sind mit einem grauen Hintergrund dargestellt. Die an den GFP-C-Terminus fusionierten GLI3-Bereiche (GFP-GLI3) sind weiß unterlegt. Das errechnete Molekulargewicht der entstehenden Fusionsproteine ist in kDa angegeben.

3.4.2 Unterschiedliche GLI-Homologiedomänen beeinflussen die subzelluläre Lokalisation der GLI3-GFP-Fusionsproteine

Um die intrazelluläre Lokalisation von GLI3 zu beobachten, wurden sechs N-terminale und sechs C-terminale GFP-Fusionskonstrukte generiert, die in den meisten Fällen die identischen GLI3-Anteile enthielten. Dabei war die Zusammenstellung dieser genspezifischen Bereiche so gewählt, daß man die Beeinflussung der subzellulären Verteilung einer oder mehreren GLI-Homologiedomänen zuordnen konnte. Nach transienter Transfektion in sowohl GLI3-mRNA exprimierende (NCI-H661, COS-7 und die humane Osteosarcomazelllinie U2-OS), als auch nicht exprimierende (NCI-H157) Zelllinien und einer anschließenden Inkubation von 24-48 h wurden die Zellen fixiert. Nach einer Kerngegenfärbung mit DAPI konnten die Präparate mit einem für die Fluoreszenzmikroskopie geeigneten Medium eingedeckt und ausgewertet werden. Bei der Auswertung der einzelnen Ansätze wurde zwischen überwiegender Kern-, Zytoplasmafärbung, bzw. der Färbung beider Kompartimente unterschieden. Die prozentuale Verteilung für die einzelnen Konstrukte ist in Abbildung 18 zusammengefaßt, wobei sich die Auswertung für alle Konstrukte und jede Zelllinie auf jeweils 100 ausgezählte und beurteilte Zellen bezieht.

Das N- bzw. C-terminale Fusionsprotein, welches nur die GLI-Homologiedomäne 1 (Abbildung 26a bzw. 27a) enthält, zeigt überwiegend eine Zytoplasmafärbung (Abbildung 26b / 27b), außer bei den U2-OS Zellen, bei denen sowohl Färbung von Kern als auch Zytoplasma in allen Zellen zu detektieren ist. Die Fusion der GLI3-Domänen 1 und 2 an GFP zeigt entweder eine Doppelfärbung, oder eine reine Kernfärbung, unabhängig von der eingesetzten Zelllinie. In den meisten Fällen (bis zu 80%) haben die individuellen Zellen allerdings eine sehr starke Kernfärbung (Abbildung 26c und 27c), so daß eine deutliche Umverteilung der Proteine Richtung Nukleus festzustellen ist, wenn das Expressionskonstrukt die DNA-bindende Domäne beinhaltet. Bei den 140 kDa schweren Fusionsproteinen, die die Homologiedomänen 1-3 beinhalten, findet man ebenfalls sowohl eine reine Kernfärbung, wie auch die Anfärbung beider Kompartimente. Hier war die erstere der beiden Beobachtung mit 60-84% der Zellen deutlich häufi-

ger vertreten (Abbildung 26d / 27d). Bei der Verbindung von GFP zum vollständigen GLI3-Protein, oder zum GLI3-Rest mit Domäne 1-6 zeigt sich überwiegend eine gleichmäßige Verteilung der entstehenden Fusionsproteine über die gesamte Zelle und damit über beide Kompartimente (Abbildung 26e, f / 27e, f). In den GLI3-mRNA negativen Zellen NCI-H157 ist sowohl für die N-, als die C-terminale Fusion des kompletten GLI3 an GFP noch ein Anteil von 30-60% der Zellen zu detektieren, die eine reine Anfärbung des Zellkerns zeigen. Abgesehen von diesen beiden Abweichungen, ist aber grundsätzlich eine erneute Tendenz bei der Verteilung der Fusionsproteine, dieses Mal Richtung Zytoplasma, festzustellen. 25-50% aller Zellen zeigt in diesem Fall eine exklusive Färbung allein dieses Zellbereichs. Für das N-terminale Deletionskonstrukt von GLI3, welches nur einen Teil der Domäne 2 und den restlichen C-Terminus enthält (150 kDa) und auch für die GLI3-GFP-Fusion mit den enthaltenen Homologiedomänen 4-6 (50 kDa) ist eine starke Färbung von Kern und Zytoplasma auszumachen. 100% der Zellen zeigen ein identisches Bild (Abbildung 26g / 27g).

Neben der grundsätzlichen Differenzierung in welchem der Zellkompartimente sich die Fusionsproteine aufhalten, wurde untersucht, ob die Färbung innerhalb dieser Bereiche homogen verteilt ist, oder bestimmten Strukturen folgt. In maximal 10% aller Zellen eines jeden Präparates waren die GLI3-GFP-Fusionsproteine nicht homogen verteilt. Eine der angefärbten, beobachteten Strukturen sind netzartige Verteilungen von Fusionsproteinen in den Zellen, die häufig noch zu kleinen perlenartigen Strukturen verdichtet (Abbildung 26c, 27c, e). Zunächst beobachtet bei der C-terminalen Fusion an GFP und enthaltener GLI3 Domäne 1 und 2, später auch bei der N-terminalen Verbindung und allen nachfolgenden Konstrukten, die einen größeren GLI3-Anteil besitzen, allerdings ist in diesen Fällen ihre Häufigkeit geringer. Zusätzlich zu diesen Strukturen konnten in anderen Zellen zytoplasmatische Aggregate beobachtet werden. Die Verteilung dieser Proteinanhäufungen schien nicht zufällig. Sie konnte nur bei den beiden größten Fusionsproteinen detektiert werden (Abbildung 26e, f / 27f). Das N-terminal deletierte GLI3 und die Homologiedomänen 4-6 assoziiert mit GFP zeigten vergleichbare Strukturen, allerdings konzentrierten sich diese Fusionsproteinen um die Kernmembran (Abbildung 27g). Aggregatbildungen, sogenannte "speckles", wie oben beschrieben zeigten sich auch exklusiv im Zellkern, unabhängig davon, ob das Zytoplasma ebenfalls Fusionsproteine enthielt oder nicht (Abbildung 26d / 27c, d). Die Verteilung dieser "speckles" scheint auch hier nicht zufällig und konnte bei fast allen Konstrukten, unabhängig von der Empfänger-Zelllinie, beobachtet werden.

All diese auffälligen Färbeverhalten wurden durch eine Expressionsstudie, bei der die Zellen 12, 16, 20, 24 und 36 h nach Transfektion fixiert und analysiert wurden, noch einmal verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Abb. 25: (Seite 127) Die subzelluläre Lokalisation der GLI3-GFP-Fusionsproteine in verschiedenen Zelllinien. Die Verteilung der verschiedenen Konstrukte ist prozentual, bezogen auf 100 gezählte Zellen angegeben. Im linken Abschnitt der Abbildung findet sich oben die schematische Darstellung des GLI3-Proteins und darunter die N-terminalen bzw. C-terminalen GLI3-GFP-Fusionsproteine mit den enthaltenen Domänen. Rechts ist tabellarisch das Färbeverhalten der einzelnen Konstrukte in den Zelllinien U2-OS, COS-7 und NCI-H157 dargestellt. Eine eindeutige zytoplasmatische Färbung ist durch „Zyt“ und eine nukleäre Färbung über „Kern“ gekennzeichnet. Das duale Auftreten der Fusionsproteine in beiden Kompartimenten wird mit „Zyt+Kern“ deutlich gemacht.

Abb. 26: (Seite 128) Färbeverhalten der N-terminalen GLI3-GFP-Fusionsproteine in U2-OS Zellen. Nach transienter Transfektion dieser Zellen mit den Fusionskonstrukten und einer Inkubation von 24-48 h, wurden die Zellen fixiert und mit einer DAPI-Lösung die Zellkerne gegengefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. In a ist das GLI3-Protein schematisch dargestellt. Im unteren Bereich rechts ist jeweils das Fusionskonstrukt dargestellt und auf der linken Seite befindet sich eine zugehörige Aufnahme mit einer beispielhaften Anfärbung der subzellulären Kompartimente. Grün dargestellt sind die Fusionsproteine und blau erscheint die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. In b und e befinden sich die Fusionsproteine ausschließlich im Zytoplasma, während alle anderen Abbildungen Variationen von dualer Lokalisation der Proteine zeigen. Abbildung c und d sind ein Beispiel für die Aggregationen im Kern, während die zytoplasmatischen in e und f beobachtet werden können. Die speziellen haarnetzartigen Strukturen sind andeutungsweise in Abbildung c zu sehen.

Abb. 27: (Seite 129) Färbeverhalten der C-terminalen GLI3-GFP-Fusionsproteine nach transienter Transfektion in U2-OS Zellen. Wie in der vorangegangenen Abbildung bereits beschrieben, konnten die Präparate nach 24-48 h Inkubationszeit über Fixierung der Zellen und Gegenfärbung der Kerne mit DAPI (Blaufärbung) über ein Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. In a findet sich die schematische Darstellung des GLI3-Proteins, während in b und den folgenden Abbildungen jeweils das Fusionskonstrukt mit einer beispielhaften Anfärbung zu sehen ist. Ein rein zytoplasmatischer Aufenthalt der Fusionsproteine (grün angefärbt) ist in b, e und f festzustellen. Die nukleäre Lokalisation sieht man in c und d, während die duale Verteilung der exprimierten Proteine in c und g gezeigt wird. Die haarnetzartigen Strukturen sind hier in c (schwach) und e zu erkennen, während die zytoplasmatischen Aggregate in f und g eindeutig hervortreten. Nukleäre "speckles" können in c und d, ansatzweise auch in g identifiziert werden.

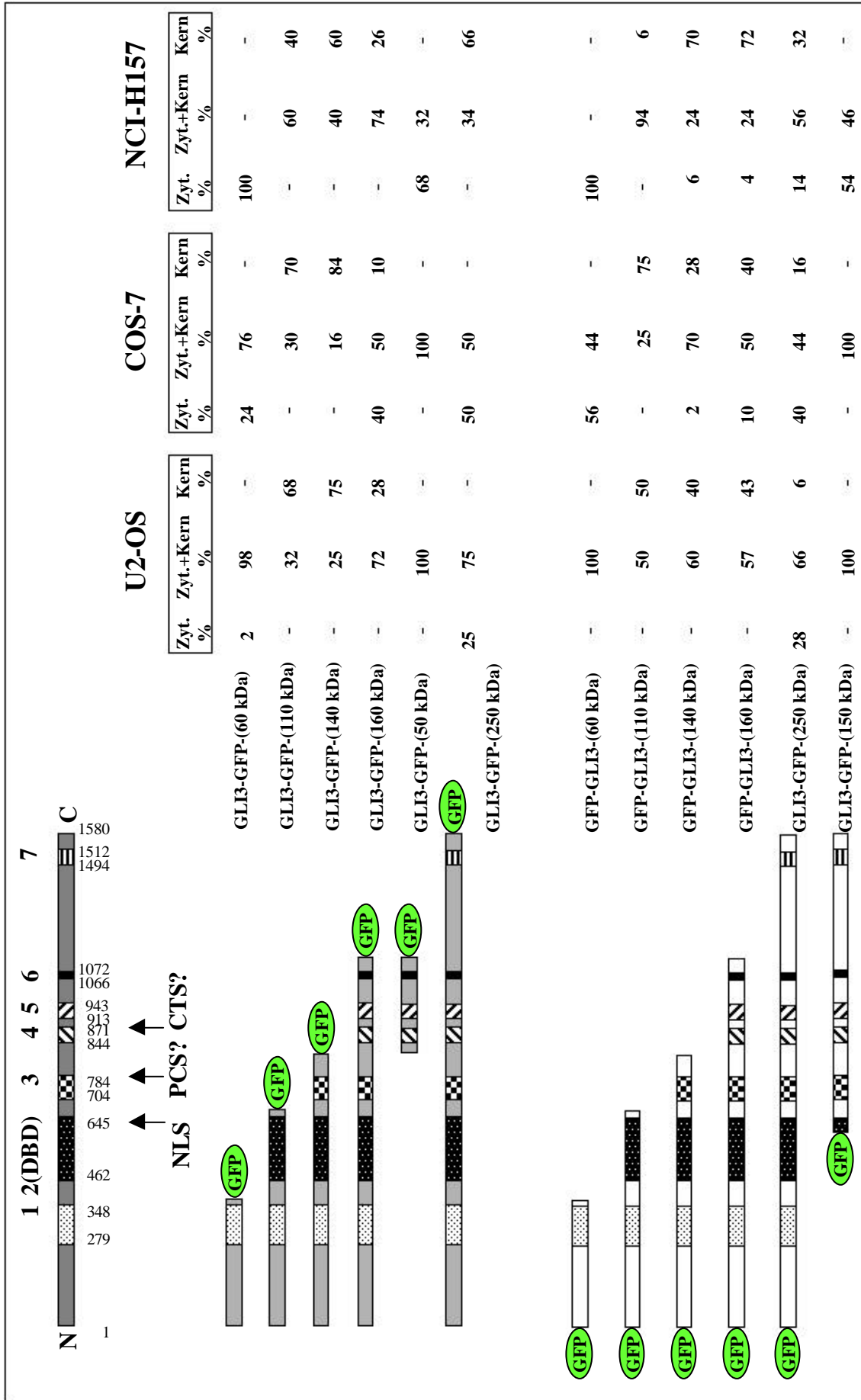


Abb. 25

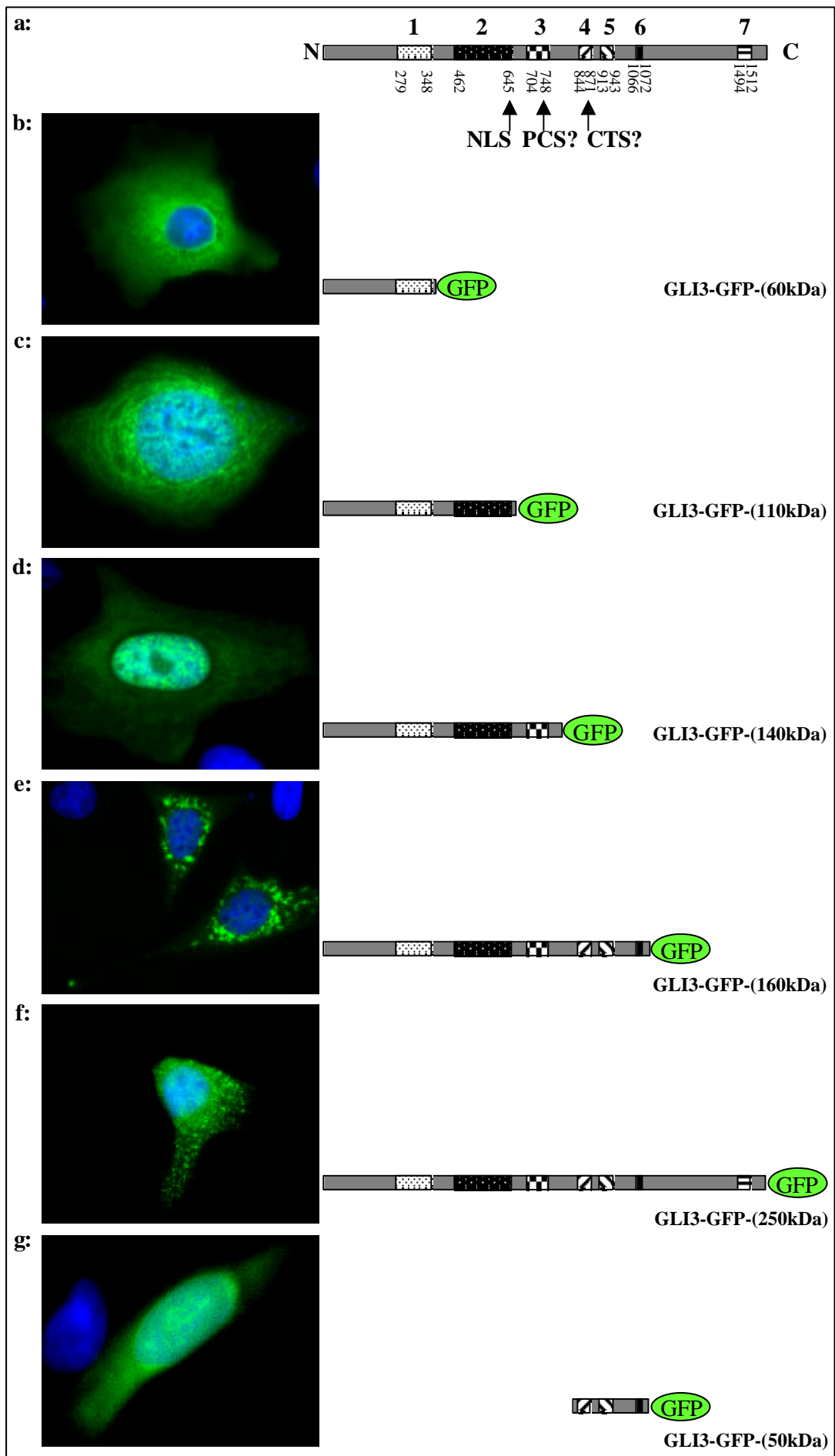


Abb. 26:

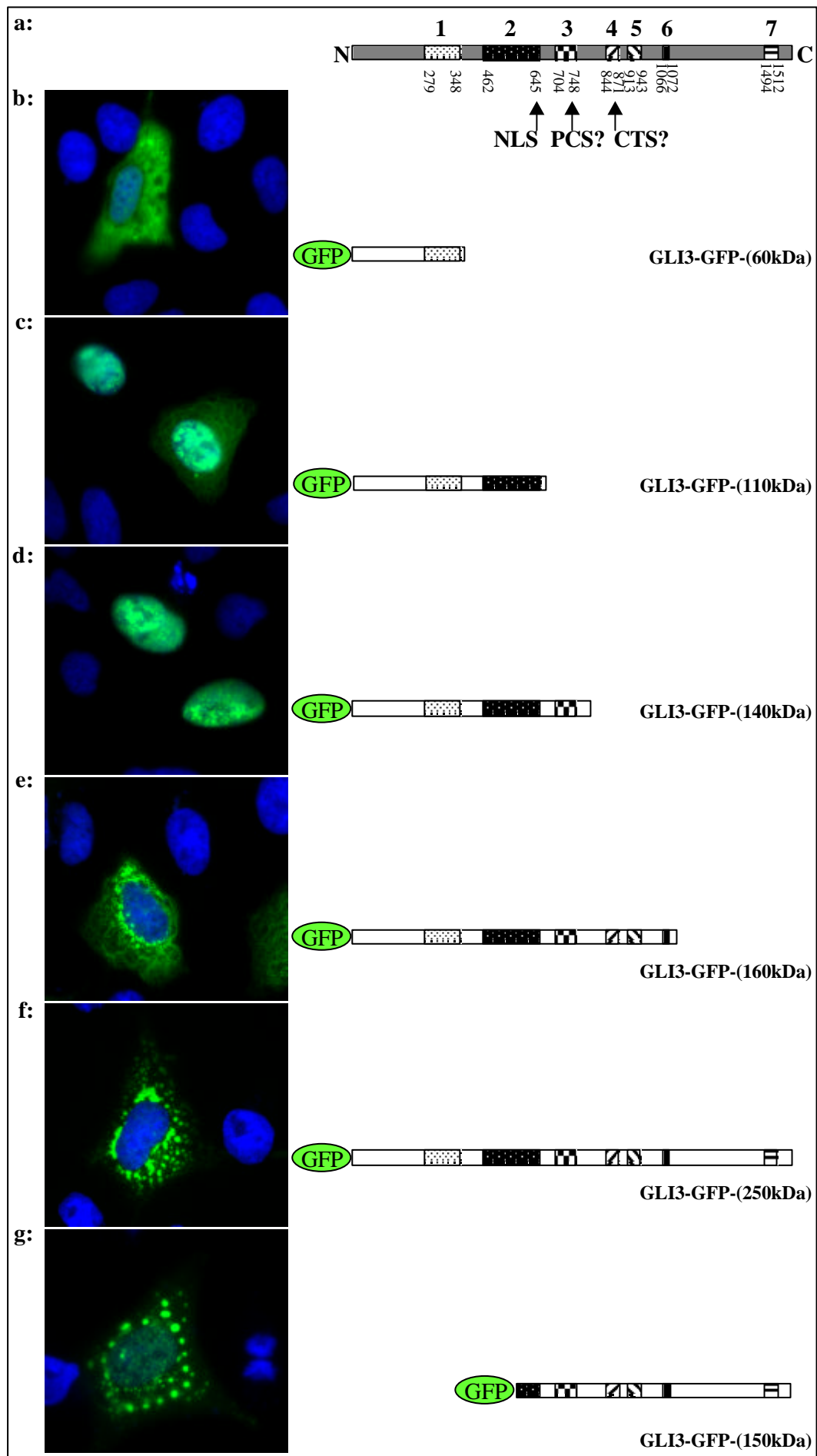


Abb. 27:

3.4.3 Untersuchung der Assoziation von GLI3 mit Zytoskelettstrukturen

Bei *Drosophila* war über die Lokalisation des ungespaltenen *cubitus interruptus* (*ci*)-Moleküls an Mikrotubuli berichtet worden (Alexandre *et al.*, 1996; Aza-Blanc *et al.*, 1997; Ohlmeyer *et al.*, 1998; Aza-Blanc *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Um festzustellen, ob sich das GLI3-Protein ähnlich verhält, wurde die Assoziation des GLI3-Proteins zu zytoskeletalen Strukturen untersucht. Dazu wurden transient transfizierte U2-OS Zellen, die das GLI3-Gesamtprotein fusioniert zu GFP exprimieren, nach Fixierung mit unterschiedlichen Antikörpern gegengefärbt, die entweder spezifisch Tubulin, Vimentin, pan-Zytokeratine oder Zytokeratin 18 erkennen. Die Aktinfilamente wurden mit Hilfe von TRITC-Phalloidin nachgewiesen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, die Filamente über die entsprechenden Primär- und Sekundärantikörper identifiziert und die Zellkerne mit einer DAPI-Gegenfärbung kenntlich gemacht. Die Präparate mit der Tubulinfärbung wurden im Anschluß sowohl mit einem Fluoreszenz- als auch mit einem konfokalen Mikroskop ausgewertet. Alle übrigen Auswertungen der Experimente fanden fluoreszenzmikroskopisch statt. Die GFP-GLI3-Fusionsproteine waren, wie in Abbildung 25 beschrieben, im Zytoplasma und im Kern lokalisiert. Im Zytoplasma war in keinem Fall eine Kolo-kalisation zwischen der Zytoskelettdarstellung und den exprimierten Fusionsproteinen auszumachen. In Abbildung 28a oben sieht man links U2-OS Zellen, die das GFP-GLI3-Fusionsprotein exprimieren und rechts die Gegenfärbung des Tubulins. Die Darstellung darunter zeigt U2-OS-Zellen in denen MID1-GFP-Fusionsprotein (Konstrukt freundlichst überlassen von S.Schweiger) exprimiert wird. Die gegenüberliegende Abbildung zeigt in der selben Zelle die Detektion der Tubulinfilamente. Bei MID1 handelt es sich um ein tubulinassoziiertes Protein (Schweiger *et al.*, 1999). Es wurde in diesem Experiment als Positivkontrolle eingesetzt. Eine Konzentrierung der Fusionsproteine am unteren linken Zellrand überlagert den Bereich des Tubulins. Das gleiche Experiment ist in Abbildung 28b noch einmal gezeigt, allerdings wurden hier die Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop generiert. Während bei der Positivkontrolle durch MID1 identische Strukturen sowohl durch das exprimierte Protein als auch durch die Tubulinfärbung in Erscheinung treten, zeigt die GLI3-Verteilung keinerlei Überlagerungen mit filamentären Strukturen. Eine entsprechende Assoziation wird durch die Entstehung einer grün-roten Mischfarbe (gelb) deutlich, die im Summationsbild für GLI3 nicht zu detektieren ist.

Bei der Testung weiterer Zytosklettstrukturen ergaben sich ebenfalls keine Anhaltspunkte für Kollokationen (Abbildung 29). Weder die Aktin- noch die Vimentinfilamente bzw. die Zytokeratine scheinen mit dem GLI3-Protein zu interagieren. Für jede dieser getesteten Strukturen findet sich eine dreigeteilte Darstellung in Abbildung 29. Das linke Bild zeigt die Lokalisation der Fusionsproteine allein, während in der Mitte die Filamentdarstellung ohne weitere Färbung zu sehen ist. Rechts befindet sich dann das Summationsbild aller dargestellten Strukturen, bestehend aus dem Fusionsprotein (grün), den Filamenten (rot) und den Kernen (blau).

Abb. 28: (Seite 132) Darstellung des GLI3-Proteins und der Tubulinfilamenten. U2-OS Zellen wurden mit dem GLI3-GFP- bzw. MID1-GFP-Expressionskonstrukt transient transfiziert und nach einer Inkubation von 24 h fixiert. Die Tubulinfilamente sind durch einen α -Tubulin Antikörper und TRITC markiertem Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Färbungen wurden mit einem Fluoreszenz- (in a) bzw. mit einem konfokalen Mikroskop (in b) ausgewertet. In den Darstellungen sind links die Fusionsproteine und rechts die Tubulinfilamente gezeigt. Für GLI3 zeigt sich im Gegensatz zu MID1 keine eindeutige Kollokation zu diesen Zytoskelettstrukturen. * Bei dieser Abbildung handelt es sich um ein vereinzeltes Mischbild, da keine alleinige Tubulindarstellung für das GLI3-Präparat vorlag.

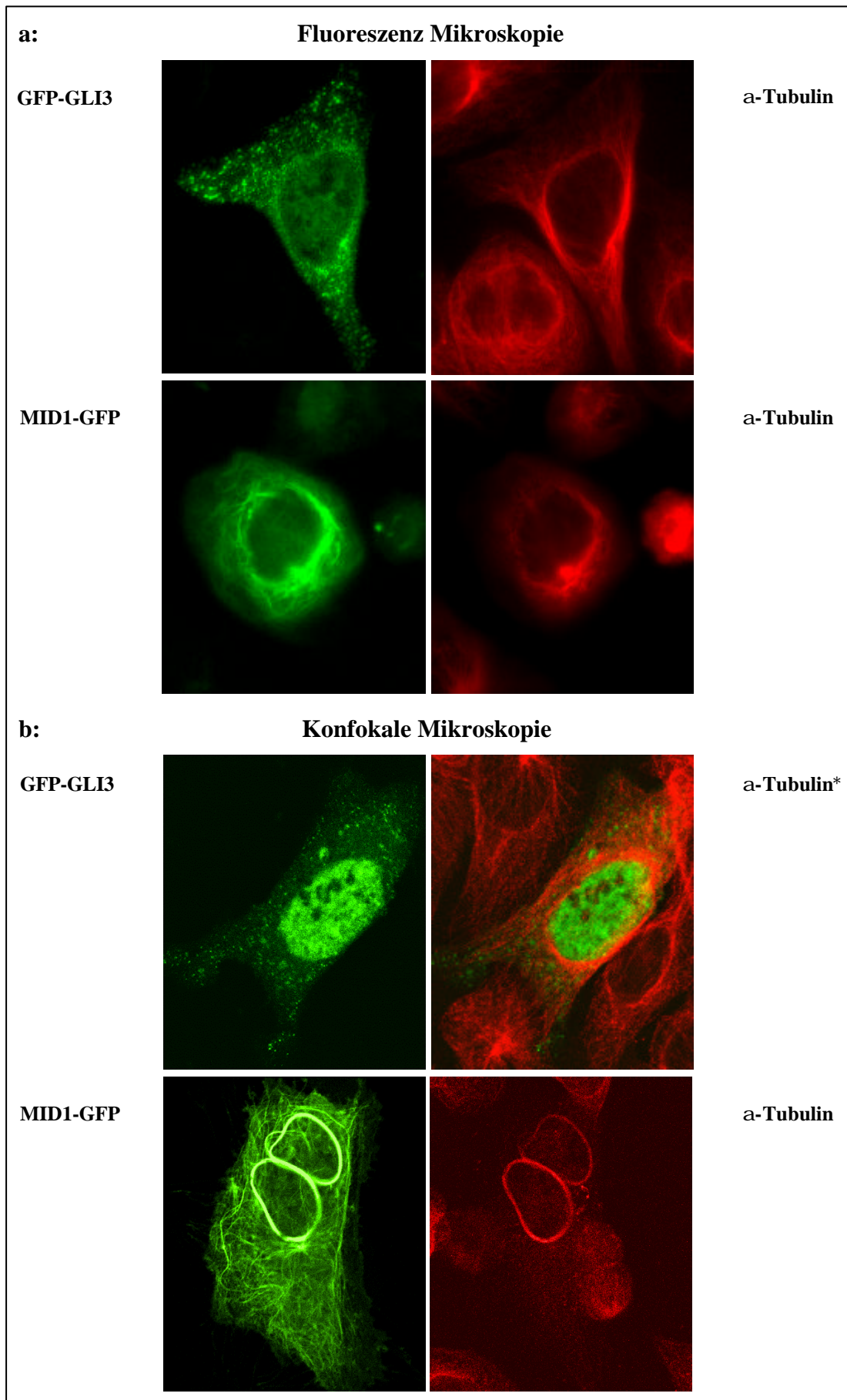


Abb. 28:

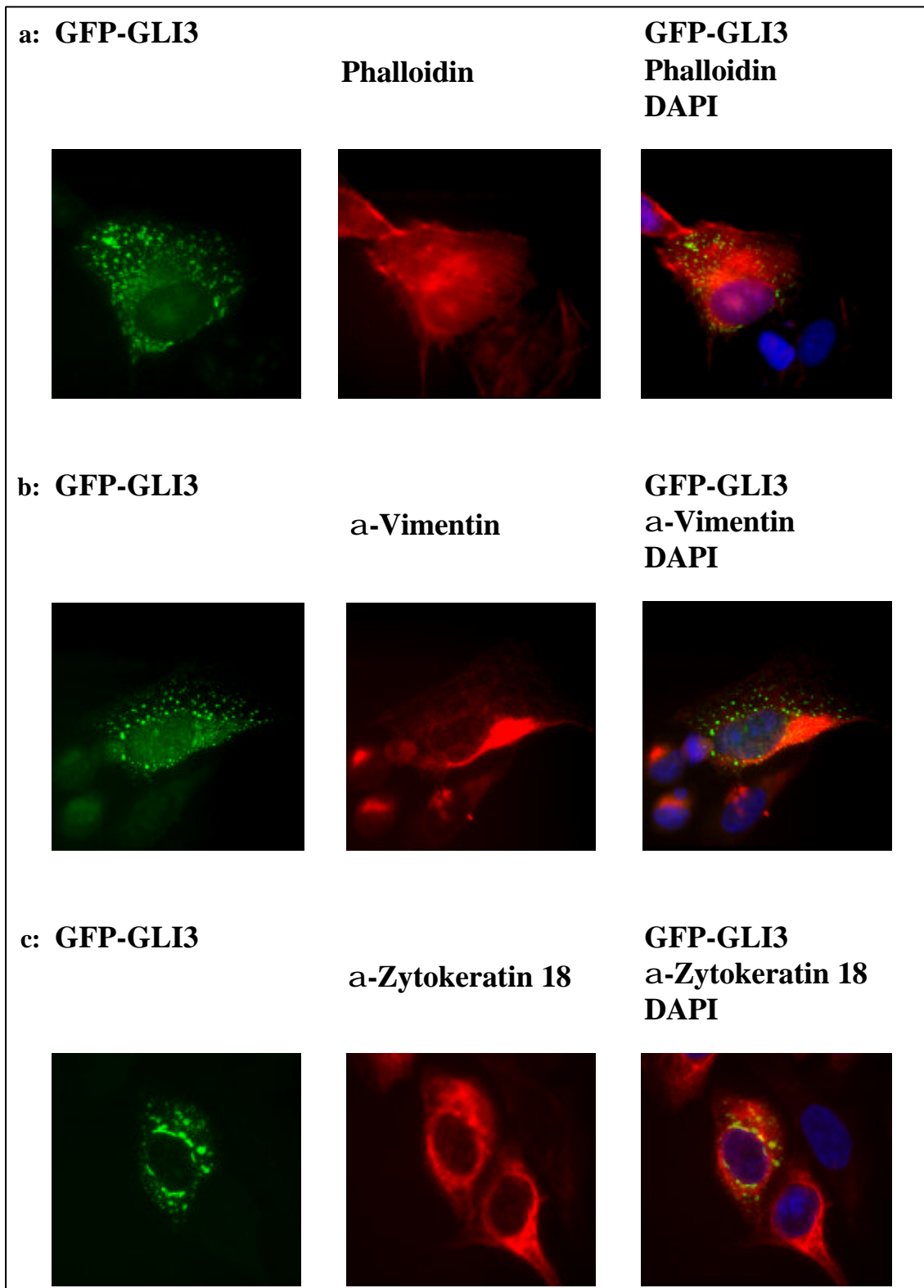


Abb. 29: Die Interaktion des TF GLI3 mit Zytoskelettfilamenten. Transient transfizierte U2-OS Zellen wurden nach 24 stündiger Inkubation mit Methanol/Azeton fixiert und anschließend eine Färbung von Zytoskelettfilamenten mit TRITC-markiertem Phalloidin (Aktin) bzw. mit spezifischen Antikörpern, die über einen TRITC-markierten α -Maus-Sekundärantikörper erkannt werden, durchgeführt. Die Ergebnisse konnten über ein Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Gezeigt ist für jedes der getesteten Filamente (a: Aktin, b: Vimentin und c: Zytokera-

tin 18) eine dreiteilige Darstellung, wobei ganz links die Fusionsproteine und in der Mitte die Filamente allein gezeigt sind. Rechts findet sich dann die Summation aller dargestellten Strukturen aus Zellkern (blau), GLI3-GFP-Protein (grün) und Filament (rot). Bei keinem dieser Zytoskelettbestandteile ist eine Assoziation mit GLI3, die durch eine Gelbfärbung zu erkennen wäre, festzustellen.

3.5 Regulation von GLI3 über posttranslationale Proteinmodifikationen

Zusätzlich zu den im Protein selbst vorhandenen Domänen nehmen auch externe Faktoren Einfluß auf seine Funktion. Das sind zum einen Bindungspartner, deren An- oder Abwesenheit entscheidend sein kann, aber zum anderen auch modifizierende Substanzen, die die Funktionsfähigkeit eines Proteins beeinflussen.

Zu Beginn sollte das endogene GLI3-Protein nachgewiesen werden. Da bereits Daten zu mRNA-Studien in unterschiedlichsten Zelllinien vorlagen (Jacobsen, 1996 und Topp, 1997), waren die als GLI3-mRNA positiv getesteten Zellen (unter anderem NCI-H661 und U2-OS) der Ausgangspunkt, um das Transkriptionsfaktorprotein nachzuweisen. Gleichzeitig konnten die als negativ getesteten Zellen (unter anderem NCI-H157 und NCI-H441) für Negativkontrollen verwendet werden. Trotz der Optimierungsarbeit bei den Western Blot Analysen war es nicht möglich, endogenes Protein aus den Zellkulturzellen in ausreichender Menge zu gewinnen, um es über SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran zu analysieren. Der spezifische Nachweis zur Anwesenheit des Proteins in den Zellen gelang lediglich über die DNA-Bindungsstudien. Hier wurden Zellextrakte positiver Zellen auf ihre Interaktionsfähigkeit mit der GLI3-spezifischen DNA-Bindungssequenz getestet, die sich in Form von DNA-Protein-Komplexen darstellte. Das an der Komplexbildung beteiligte Protein wurde dann über die GLI3-spezifischen N- und C-terminalen Antikörper nachgewiesen (Abschnitt 3.2.2 und Abbildung 13).

3.5.1 Nachweis exprimierter GLI3-GFP-Fusionsproteine nach transienter Transfektion

Da ein Nachweis des endogenen GLI3-Proteins mittels spezifischer α -GLI3-Antikörper in nachweislich GLI3-mRNA exprimierenden Zellen nicht möglich war, wurden Zellen

transient transfiziert und nach Gewinnung von Zellextrakten auf die Anwesenheit des Proteins hin analysiert. Die in Kapitel 3.4 beschriebenen eukaryontischen Expressionskonstrukte, die zu Fusionsproteinen von unterschiedlichen GLI3-Domänen und dem GFP führen, wurden transient in U2-OS und Hek 293 Zellen transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 bis 48 h konnten Gesamtzell- und Kernextrakte gewonnen werden, die über eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Bei der nachfolgenden Western Blot-Analyse wurden sowohl die GLI3-spezifischen N- oder C-terminalen, als auch ein GFP-spezifischer Antikörper als primärer Reaktionspartner eingesetzt. Der Nachweis der Proteinbanden fand über einen α -Kaninchen-HRP-gekoppelten Zweitantikörper und eine Chemilumineszenz-Reaktion statt. In Abbildung 30 ist für Gesamtzellextrakte der Proteinnachweis der einzelnen C-terminal fusionierten GFP-GLI3-Konstrukte mittels α -GFP-Antikörper links dargestellt. Es ergibt sich für jedes der gebildeten Proteine nur eine spezifische Bande, die mit einer schwarzen Pfeilspitze gekennzeichnet ist. Das gesamte GLI3 fusioniert an GFP erreicht ein Molekulargewicht von ca. 250 kDa, während GLI3-Domäne 1-6 größer als 160 kDa ist. Die GFP-Fusion mit GLI3-Domänen 1-3 laufen auf Höhe der 140 kDa Bande, bzw. mit Domäne 1+2 bei ca. 110 kDa und Domäne 1 fusioniert mit GFP zeigt ein Gewicht von 75 kDa. Auf der rechten Seite befindet sich die Identifikation des Gesamt-GLI3 Proteins mit den entsprechenden GLI3-spezifischen Antikörpern. Sowohl für den N-terminalen als auch den C-terminalen Nachweis ist gleichzeitig ein Extrakt aus GLI3-mRNA negativen Zellen als Negativkontrolle abgebildet. Das den Aminoterminus erkennende Antiserum zeigt neben dem spezifischen (250 kDa) auch zwei unspezifische Signale, die sich ebenfalls in den Extrakten der nicht transfizierten, GLI3-negativen NCI-H441 Zellen wiederfinden. Der über den C-Terminus gestaltete Proteinnachweis detektiert dagegen nur die eine spezifische Bande.

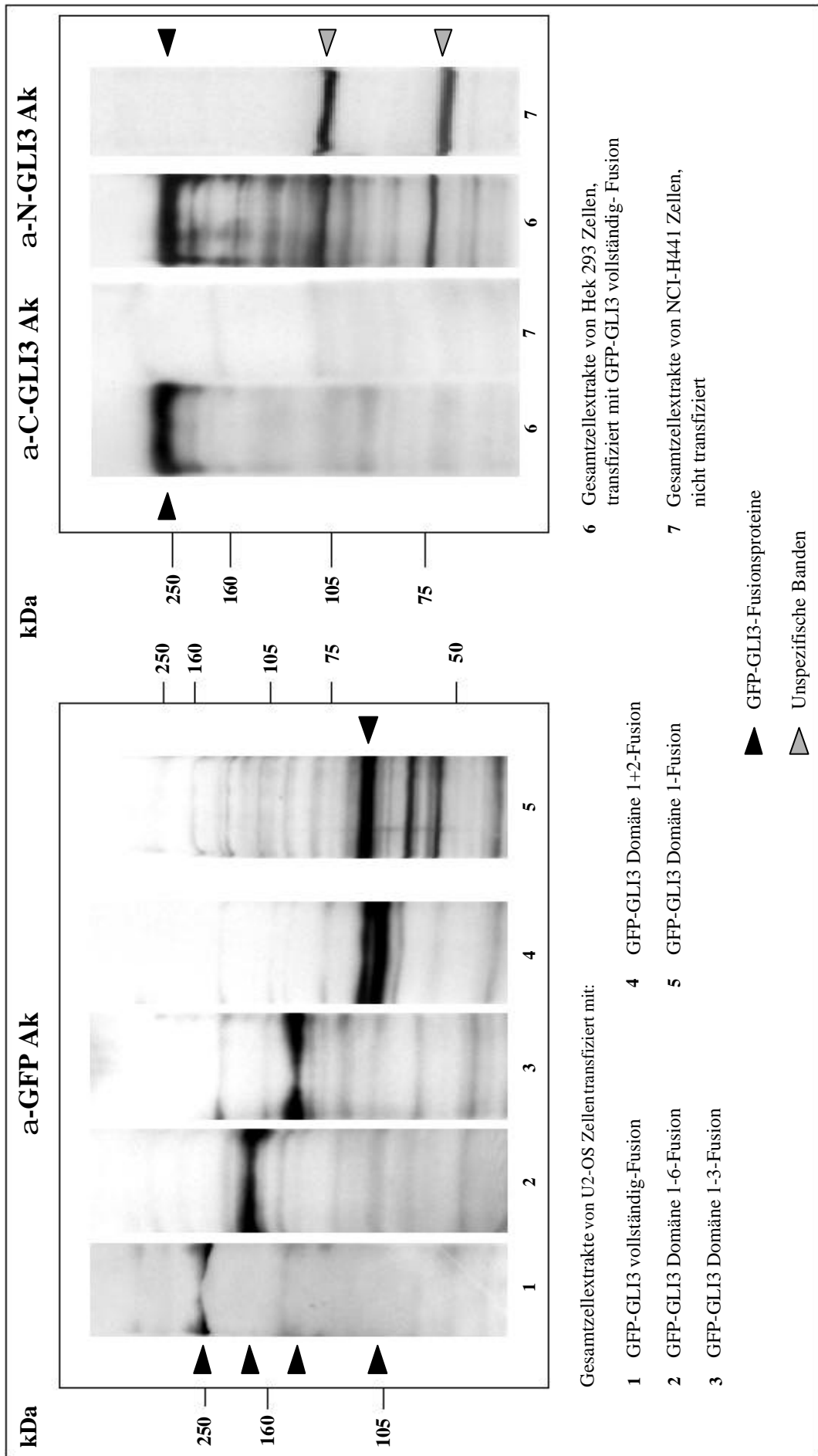


Abb. 30

Abb. 30: Nachweis der GFP-GLI3-Fusionsproteine nach transienter Transfektion mittels eines GFP-spezifischen bzw. der GLI3-spezifischen Antikörper. Gesamtzellextrakte aus den mit den C-terminalen GFP-GLI3-Fusionen transient transfizierten U2-OS und Hek 293 Zellen wurden in einer Gesamtkonzentration von 100-150 μg mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die verschiedenen Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben. Die Western Blot-Analyse der aufgetrennten Proteine fand unter Nutzung der IgG-Fraktion von $\alpha\text{-NH}_2\text{-GLI3}$ (Serum 711), der $\alpha\text{-COOH-GLI3}$ (Serum 072; rechts) und des $\alpha\text{-GFP}$ -Antikörpers (links) statt. Die schwarzen Pfeilspitzen markieren die jeweilige spezifische Proteinbande (GLI3-komplett-GFP 250kDa; GLI3-D1-6 größer als 160 kDa; GLI3-D1-3 140 kDa; GLI3-D1+2 110 kDa; GLI3-D1 ca. 75kDa). Mit grauer Pfeilspitze sind die unspezifischen Proteinbanden gekennzeichnet (115 kDa und 75 kDa), die durch den $\alpha\text{-NH}_2\text{-GLI3}$ -Antikörper detektiert wurden und auch in den nicht transfizierten, GLI3-negativen NCI-H441 Zellen zu sehen sind.

3.5.2 Induzierte GLI3-Phosphorylierung

Anhand der Western Blot-Analyse mit Gesamtzellextrakten aus U2-OS und Hek 293 Zellen, nach transienter Transfektion mit dem GFP-GLI3-Fusionskonstrukt, konnte das GLI3-Fusionsprotein mit 250 kDa in seiner vollen Länge detektiert werden, aber keine der in der Literatur (Dai *et al.*, 1999; Ruiz i Altaba, 1999b; Shin *et al.*, 1999; Aza Blanc *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000b) postulierten, trunkierten Formen. Um der Frage nachzugehen, ob die Spaltung von GLI3 von einer Phosphorylierung des Moleküls abhängen könnte, wurde über chemische Substanzen die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) in Zellkulturzellen hochreguliert. Forskolin (FSK) als membrandurchlässiger Aktivator der Adenylatzyklase führt zur Aktivierung der PKA, während das Didesoxy-Analogon (ddFSK) unwirksam ist. U2-OS Zellen wurden dafür, wie in 2.3.2.2 beschrieben, transient mit dem C-terminalen GFP-GLI3-Fusionskonstrukt transfiziert und dann 15 h mit 25 μM Forskolin, 25 μM Didesoxyforskolin oder mit deren Lösungsmittel DMSO (1:1000, v/v) behandelt. Nach insgesamt 48 stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen zur Extraktgewinnung geerntet und die Proteine über Western Blot analysiert. Die Behandlung der U2-OS Zellen mit FSK, nicht aber ihre Behandlung mit ddFSK oder DMSO resultierte in einer langsamer wandernden Form des GFP-GLI3-250 kDa Proteins, was über die Auftrennung mit einem 5% Polyacrylamidgel detektiert werden kann. Diese Veränderung im Wanderungsverhalten des Fusionsproteins konnte sowohl mit dem, für den GLI3-N-Terminus spezifischen (Abbildung 31 oben, Spur 2;), als auch mit dem für das GFP-Protein spezifischen Antikörper (Abbildung 31 oben, Spur 5) nach-

gewiesen werden. Spaltprodukte von GLI3 konnten auch nach Phosphorylierung nicht detektiert werden (Abbildung 31 unten, Spur 2 und 5).

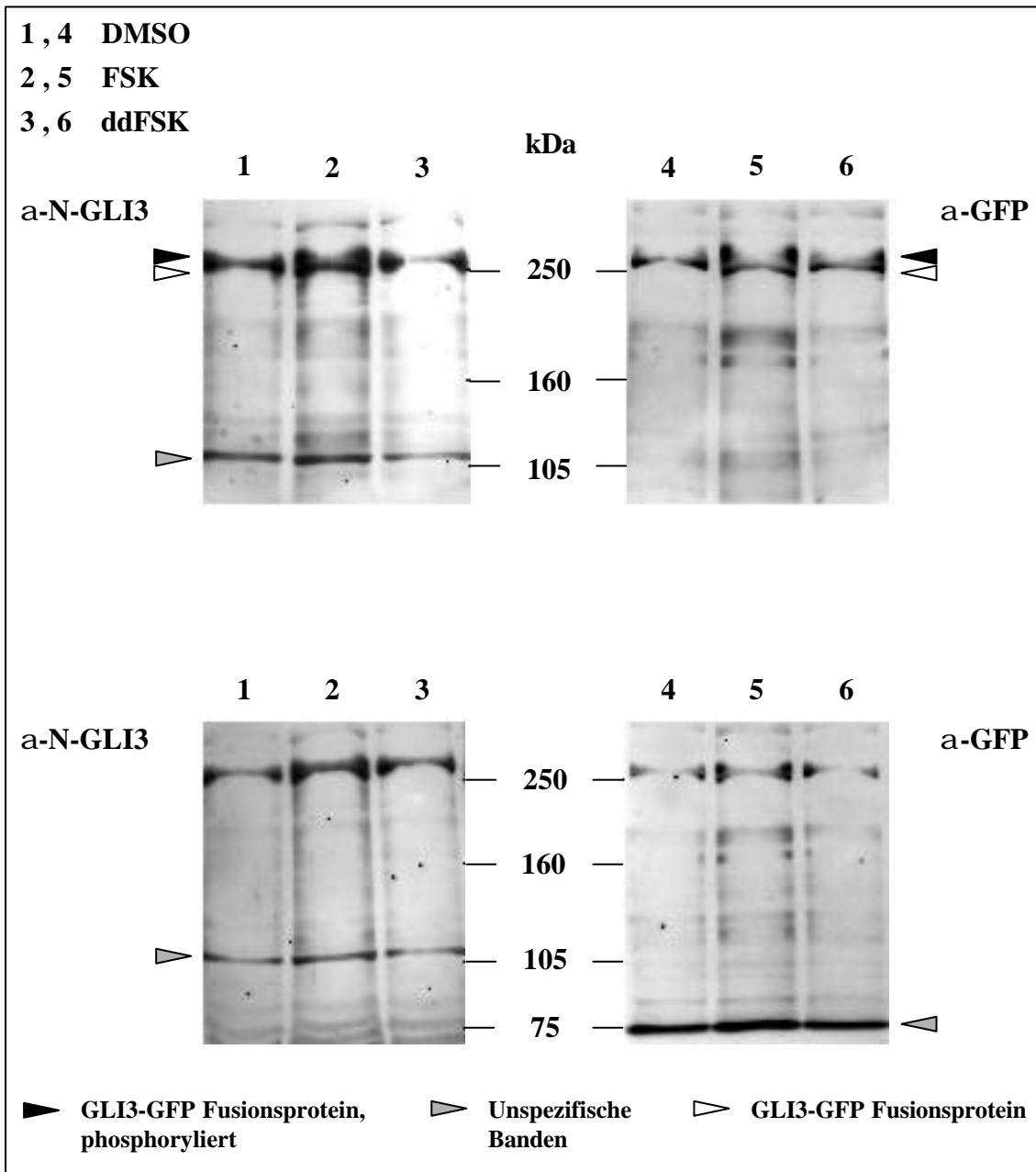


Abb. 31: Nachweis der Phosphorylierung von GLI3 über PKA in Zellkulturzellen. Nach transienter Transfektion mit dem GLI3-GFP-Fusionskonstrukt zur Expression des gesamten GLI3-Proteins, wurden U2-OS Zellen für 15 h mit Forskolin (FSK, 25 μ M), Didesoxyforskolin (ddFSK, 25 μ M) und DMSO (1:1000, v/v) behandelt und danach Gesamtzellextrakte gewonnen. Identische Mengen von Protein wurden auf einem 5% Polyacrylamidgel für ca. 4 h aufgetrennt und die spezifischen Proteinbanden über α -NH₂-GLI3 (Serum 711) bzw. α -GFP Antikörper sichtbar gemacht. Die nach Forskolinbehandlung langsamer wandernde phosphorylierte Form des Fusionsproteins ist jeweils über eine schwarze Pfeilspitze markiert (Spur 2 und 5 oben). Die übrigen Zellmanipulationen führten zu keiner Veränderung beim exprimierten Prote-

in (Spur 1, 3, 4, 6; weiße Pfeilspitze). Um auch kleinere Proteine bzw. Proteinfragmente darstellen zu können, wurden Gele unter identischen Bedingungen hergestellt und beladen, aber die Gellaufzeit um ca. 1 h verkürzt. Auch unter diesen Bedingungen konnten keine zusätzlichen, spezifischen Proteinbanden sichtbar gemacht werden (Spur 2 und 5 unten). Die Antikörper-bedingt auftretenden unspezifischen Banden sind hier mit grauen Pfeilspitzen gekennzeichnet.

4. Diskussion

4.1 Die Sonic Hedgehog (SHH)-GLI3-Signalkaskade: Embryogenese und Entstehung von Erkrankungen beim Menschen

Sonic hedgehog (Shh) als sekretiertes Morphogen der polarisierenden Zone (ZPA) ist das Ausgangsmolekül der antero-posterioren Achsendetermination bei der Gliedmaßenentwicklung. Seine Bildung und Freisetzung durch die posterioren Zellen der Gliedmaßenknospe setzt nach Erreichen des anterioren Anteils dieser Struktur und der Bindung an den Rezeptorkomplex eine spezifische Signalkaskade in Gang. Sie bewirkt zusammen mit den anderen Positionssignalen, die der Determination der proximo-distalen und dorso-ventralen Achse dienen, die exakte Anordnung der einzelnen Gliedmaßenkomponenten. Ihre Lage und Form z.B. als Oberarm, Unterarm mit Elle und Speiche, Handflächen mit den einzelnen Fingern in den vorderen Extremitäten wird auf diese Weise festgelegt. All diese Bestandteile bilden zusammen eine funktionelle Einheit, deren exakte Interaktionen ein Nachweis für das zuvor vorhandene präzise Zusammenwirken der beteiligten Entwicklungsfaktoren ist (Cohn *et al.*, 1996; Innis *et al.*, 1998; Manouvrier-Hanu *et al.*, 1999; Catala, 2000). Kommt es zur Fehlregulation eines dieser Faktoren, so resultiert daraus eine der als HSD (Hedgehog signaling related diseases) bezeichneten Hedgehog vermittelten Erkrankungen. Diese können, abhängig vom betroffenen Mitglied der Hedgehog-Signalkaskade, sehr unterschiedlich in ihrer Ausprägung sein. Ist das polarisierende Signalprotein selbst verändert, so führt das zur Holoprosencephalie (HPE), einer Entwicklungsstörung, die unter anderem durch Fehlbildungen im Gehirn und Gesicht geprägt ist. Eine Dysregulation innerhalb der Cholesterinbiosynthese hat eine Auswirkung auf alle sterolabhängigen Prozesse während der Entwicklung und im Erwachsenenalter, unter anderem auch auf die posttranslationale Modifikation des Hedgehog-Proteins. Sie bewirkt das HPE ähnliche Smith-Lemli-Opitz Syndrom, das sich durch Mittellinien-Defekte und durch Fehlbildungen bei den Gliedmaßen in Form von Syn- und vereinzelt auch Polydaktylien auszeichnet. Veränderungen innerhalb des Rezeptorkomplexes, bestehend aus Patched und Smoothened, die das Hedgehog-Signal an das Zellinnere weiterleiten, führen zu verschiedensten Tumoren wie Medulloblastom, Rhabdomyosarcom, Basalzellkarzinom und malignen Entartungen bei der Blutbildung. Das Gorlin-Syndrom, auch Basalzellnävus Syndrom (BCNS) genannt, ist wohl die be-

kannteste *Patched-1* assoziierte Fehlbildung. Neben dem erhöhten Risiko der malignen Transformation, zeichnet es sich durch entwicklungsbedingte Defekte, wie Rippendefekte, Zahnabnormalitäten, Augenveränderungen und Handfehlbildungen aus. CREB-bindendes Protein (CBP) interagiert als Koaktivator des Hedgehog-Signals mit dem Transkriptionsfaktor GLI3. Mutationen innerhalb dieses Helferproteins, die zu einer Halbierung der Gendosis führen, begründen das Rubinstein-Taybi-Syndrom (RTS). Neben einem hier ebenfalls erhöhten Tumorrisiko, einer mentalen Retardierung, einer Gesichtsschädeldysmorphie und einer verzögerten Knochenreifung, zeichnet sich auch diese Erkrankung durch Fehlbildungen der Extremitäten in Form von breiten Daumen bzw. Großzehen und Syndaktylien aus. Trotz der zum Teil sehr heterogenen Syndrome und Symptome, die mit den HSDs assoziiert sind, deuten viele der erwähnten entwicklungsbedingte Fehlbildungen auf den gemeinsamen Ursprung der Störung in der Hedgehog-Kaskade hin (Altaba, 1999; Villavicencio *et al.*, 2000; Kelly, 2000; Beachy *et al.*, 2001). Das DNA-bindende Molekül der Sonic Hedgehog-Signalkaskade, GLI3, stellt in dieser Hinsicht keine Ausnahme dar. Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz sind auch in diesem Fall mit Fehlbildungen assoziiert. Die Heterogenität innerhalb der Hedgehog-assoziierten Erkrankungen, ausgelöst durch die völlig unterschiedlichen Kaskadenmitglieder, wird durch die mit GLI3 verbundenen Syndrome wiedergespiegelt. Vier verschiedene, in ihrer Ausprägung sehr unterschiedliche Fehlbildungen sind mit Veränderungen innerhalb des *GLI3*-Gens assoziiert. Das Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom (GCPS) ist gekennzeichnet durch präaxiale Polydaktylie der Füße, postaxiale Polydaktylie der Hände, Syndaktylien an Händen und Füßen, verbreiterte Daumen und Großzehen und charakteristische Gesichts- und Schädelanomalien. Das autosomal dominante Pallister-Hall Syndrom (PHS) besitzt als klinische Zeichen ein hypothalamisches Hamartom, zentrale und postaxiale Polydaktylie, Syndaktylie, Anusatresie, Kehlkopfklappenfehlbildungen, faciale Abnormitäten und gelegentlich eine Assoziation zur Holoprosencephalie. Die Präaxiale Polydaktylie Typ IV (PPD-IV) und die Postaxialen Polydaktylien (Typ A und Typ A/B kombiniert) zeichnen sich jeweils durch eine isolierte Form der Polydaktylie aus. Bei PAP-A entwickelt sich dabei ein zusätzlicher 5. Finger, der funktionell ist, während bei PAP-B nur ein Hautanhängsel (Postminus) ohne Funktion entsteht. All diesen mit *GLI3* und auch einigen der mit der *SHH*-Signalkaskade assoziierten Erkrankungen sind die Gliedmaßenfehlbildungen gemeinsam, welche auf die gemeinsame Ursache, die Störung der anterior-posterior steuernden Signale, hindeutet. Wenn auch die sehr unterschiedlichen Syndrome der

HSDs mit der differenzierten Wirkung verschiedener Faktoren wie SHH, PATCHED-1, SMOOTHENED und CBP erklärt werden kann, greift diese Erklärung bezüglich der *GLI*-assoziierten Syndrome nicht. Mutationen im gleichen Protein sind in diesem Fall in der Lage, zu ganz unterschiedlichen Ausprägungen zu führen (siehe Abbildung 8 in Kapitel 1.5.1). Dabei läßt der Genotyp, das heißt Art und Position der Sequenzänderung, keine Rückschlüsse auf den daraus resultierenden Phänotyp zu. Sowohl große Deletionen oder Translokationen, die das *GLI3*-Gen betreffen, als auch Punktmutationen konnten bei GCPS Patienten diagnostiziert werden (Vortkamp *et al.*, 1991; 1992; Wild *et al.*, 1997; Radhakrishna *et al.*, 1997; 1999; Kalff-Suske *et al.*, 1999). Eine auf Grund dieser Sequenzveränderungen bewirkten Halbierung der Gendosis ist eine Erklärungsmöglichkeit für alle Greig-Fälle. In Anbetracht der Heterogenität der *GLI3*-assoziierten Phänotypen, kann in all den verschiedenen Syndromen wie z.B. PHS, GCPS oder auch PAP-A nicht immer nur die Haploinsuffizienz des Gens der Auslöser sein. Die Vorstellung eines zusätzlichen Mechanismus liegt daher sehr nahe. Dabei kann es sich zum einen um eine Mutation in der zweiten Kopie des *GLI3* Gens handeln, wodurch eine ohnehin reduzierte Menge des Genproduktes noch weiter gesenkt würde. Eine vergleichbare Wirkung könnte auch eine, zusätzlich zur *GLI3*-Sequenzänderung, vorhandene Mutation in genannten "Modifier-Genen" der SHH-Kaskade, oder in paralogen *GLI*-Genen haben. Eine Störung in der Signalweiterleitung unabhängig vom Transkriptionsfaktor kann ebenfalls zu einem verminderten Transaktivierungspotential führen, wodurch die Zielgene nicht mehr ausreichend aktiviert werden. Um diese Möglichkeiten zu testen, muß entweder geprüft werden, ob beide *GLI3*-Allele anwesend und intakt sind, oder eine Mutationsuche für weitere SHH-Signal assoziierte Gene etabliert werden.

Neben der Wirkung durch Reduktion des Signals in Folge einer verminderten Proteinmenge, ist auch eine Änderung in der Proteinwirkung auf funktioneller Ebene vorstellbar. In diesem Fall bleibt die Quantität des Genproduktes *GLI3* zwar unverändert erhalten, aber es kommt zu einer funktionellen Haploinsuffizienz, oder gar zu einer dominant negativen Wirkung. Dabei kann das exprimierte Protein allein der Auslöser sein, wenn nämlich die entsprechende Mutation in einer funktionell bedeutenden Domäne liegt und diese dadurch zerstört wird. Oder aber die für eine Funktion wichtige Assoziation mit einem Kofaktor wird durch Sequenzänderung innerhalb von *GLI3*, oder innerhalb des Kofaktors unmöglich.

Bei nicht trunkierenden, Missense-Mutationen ist eine Abnahme der Expressionsmenge des Proteins nicht zwingend. Der Austausch von Aminosäuren beeinflusst nicht unbedingt die absolute Quantität, wohl aber die funktionelle Qualität des betroffenen Proteins. Bei Analysen zur Funktion eines Proteins stellen deshalb die detektierten Missense-Mutationen eine gute Grundlage dar, bereits bekannte Proteindomänen in ihrer Wirkung zu analysieren, oder aber neue Proteindomänen anhand ihrer Funktion aufzudecken. Die in GLI3 detektierten nicht trunkierenden Sequenzänderungen wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit auf Grund ihrer Lage im Protein (siehe Abb. 8, Kapitel 1.5.1 und Abb. 7, Kapitel 1.4.3) bezüglich ihres Einflusses auf die bereits bekannten Funktionen der DNA-Bindung und der transaktivierenden Wirkung getestet (Ruppert *et al.*, 1988; 1990; Kinzler *et al.*, 1990; Vortkamp *et al.*, 1995b; Dai *et al.*, 1999; Kalff-Suske *et al.*, 1999). Die zu einem Aminosäurekettenabbruch führenden Mutationen von GLI3 enthalten nur noch gewisse Domänen des Proteins. Der Einfluß dieser fehlenden Domänen auf die mögliche Modifikation und Lokalisation des GLI3-Proteins wurde mit Deletionskonstrukten getestet, die diese trunkierenden Mutationen nachahmen.

4.2 DNA-Bindung des GLI3-Proteins bei Gelretardierungsexperimenten

Als Mitglied der GLI-Transkriptionsfaktorfamilie zeichnet sich GLI3 durch eine DNA-bindende Zinkfingerdomäne vom C₂H₂-Typ aus. Dieser innerhalb der Familie und in Orthologen hochkonservierte Proteinbereich erkennt eine spezifische, 9 bp lange DNA-Bindungssequenz (-TGGGTGGTC-) und interagiert mit ihr (Alexandre *et al.*, 1996; von Ohlen *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 1999). Diese Protein-DNA-Wechselwirkung stellt die Grundlage eines Regulationsmechanismus von Genen dar. Im Fall von GLI3 werden durch diese Bindung die Transkription von Zielgenen in der Sonic Hedgehog-Signalkaskade aktiviert (Ruppert *et al.*, 1988; 1990; Kinzler *et al.*, 1990; Zarkower *et al.*, 1993; Vortkamp *et al.*, 1995b). Diese DNA-Protein-Interaktion wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* über Gelretardierungsexperimente nachgewiesen. In NCI-H661 Zellen endogen exprimierte GLI-Proteine zeigten eine spezifische Interaktion mit der GLI-Konsensussequenz. Die gebildeten Protein-DNA-Komplexe konnten konzentrationsabhängig durch Zugabe spezifischer Kompetitor-DNA verhindert werden (Abbildung 13, Kapitel 3.2.1). Da ein unspezifischer Kompetitor keinen Einfluß auf die Kom-

plexbildung hatte, kann die Interaktion zwischen den GLI-Proteinen und der Konsensussequenz als spezifisch bezeichnet werden.

In den im Kapitel 3.2.1 erwähnten Expressionsstudien der *GLI*-Gene (Northern Blot Analysen in Jacobsen, 1996 und Topp, 1997) konnte gezeigt werden, daß in NCI-H661 Zellen sowohl GLI3, als auch GLI1 und GLI2 Transkripte enthalten. Da alle Mitglieder der GLI-Genfamilie mit der gleichen DNA-Bindungssequenz interagieren können, kann eine Identifizierung der Interaktionspartner im DNA-Protein-Komplex nur anhand spezifischer Antikörper möglich sein. Ihre Zugabe zur Bindungsreaktion erzeugt durch eine erneute Größenzunahme das eine zusätzliche Retardierung im Laufverhalten des DNA-Proteinkomplexes (Supershift). Die gegen den N- und C-Terminus von GLI3 gerichteten Antikörper zeigten ein unterschiedliches Verhalten bei der Interaktion mit den Komplexen. Den stärkeren DNA-Protein-Komplex konnten beide Antiseren erkennen, während der schwächer auszumachende Komplex nur mit dem α -N-GLI3-Antikörper interagieren konnte. Diese Beobachtung kann auf verschiedenen Ursachen beruhen. Ein Grund könnte die unterschiedliche Nachweisempfindlichkeit der Antiseren sein. Wie in Abbildung 12 (3.1.2) gezeigt, kann bei dem gleichen Verdünnungsfaktor, das gegen den N-Terminus von GLI3 gerichtete Antiserum im Vergleich zu den C-terminal spezifischen Antiseren die 5-fach geringere Proteinmenge noch detektieren. Das heißt, die Detektionsempfindlichkeit des C-terminalen Antikörpers könnte für den schwächeren Komplex nicht ausreichend sein. Eine zweite Überlegung ergibt sich aus der Tatsache, daß der schwächere Komplex weniger retardiert ist als der stärkere. Unterschiede im Wanderungsverhalten können durch unterschiedliche Formen von GLI3, wie z.B. Mono- bzw. Multimerbildung oder Spaltprodukte ausgelöst werden. Andererseits erwartet man, daß die anderen Mitglieder der GLI-Proteinfamilie (GLI1 und GLI2) zu einer Komplexbildung führen. Während GLI3 und GLI2 ähnlich groß sind und sich höchstwahrscheinlich deren DNA-Proteinkomplexe nicht durch das Laufverhalten unterscheiden, erwartet man für GLI1 auf Grund des deutlich geringeren Molekulargewichts einen kleineren Komplex. Auf Grund des hohen Grades der Homologie in dem, wenn auch kleinen Zinkfingeranteil, des N-terminalen Antigens ist eine Kreuzreaktion des entsprechenden Antiserums mit den anderen GLI-Proteinen nicht endgültig auszuschließen. Eine endgültige Identifizierung des Interaktionspartners in dem kleinen DNA-Protein-Komplex ist entweder nur über spezifische Antiseren gegen die anderen GLI-Familienmitglieder, insbesondere GLI1, zu erzielen, oder über den Nachweis zusätzli-

cher, endogener GLI3-Formen in einem anderen Testsystem, wie z.B. der Western Blot-Analyse.

Abschließend kann man festhalten, GLI3 sowohl auf Transkript- wie auch auf Proteinebene in NCI-H661 Zellen nachgewiesen werden konnte. Die etablierten Reaktionsbedingungen ermöglicht den Nachweis einer spezifischen Interaktion zwischen DNA und Protein und dient im folgenden dazu, das Bindungsverhalten von unverändertem Wildtyp- mit mutiertem Zinkfinger-Peptid zu vergleichen.

4.3 GLI3-Zinkfinger-Peptide und ihre DNA-Bindungs-fähigkeit

Der gesamte Zinkfinger-kodierende Bereich von GLI3 (Aminosäure 462 bis 645) wurde über einen prokaryotischen Expressionsvektor als Zinkfingerpeptid exprimiert. Dieses exprimierte Wildtyp-Peptid wurde in der vorliegenden Arbeit mit über gerichtete Mutagenese punktmutierten Zinkfingerpeptiden bezüglich ihrer Fähigkeit zur DNA-Interaktion verglichen. Die eingebrachten Punktmutationen repräsentierten dabei nichttrunkierende Missense-Mutationen in der DNA-bindenden Domäne, die bei Polydaktyliepatienten detektiert worden waren (siehe Abbildung 8, Kapitel 1.4.3).

Der Einzelbasenaustausch an der Nukleotidposition 1542 bzw. 1558 der GLI3 cDNA (Ruppert *et al.*, 1990) führt zu Aminosäurewechslern an Position 515 bzw. 520. In beiden Fällen ist ein hochkonservierter Cysteinrest der C₂H₂-Zinkfingerstruktur betroffen. Die Aminosäure 515 repräsentiert dabei das erste Cystein des zweiten Zinkfingers und aa 520 steht für den zweiten Cysteinrest des selben Zinkfingers (Abbildung 15, Kapitel 3.2.2.1). Die an diesen Positionen mutierten Zinkfinger-Peptide sollten nicht mehr in der Lage sein, mit der doppelsträngigen DNA zu interagieren. In der Wildtypsituation koordinieren sich beide Cysteine, innerhalb einer β -Faltblattstruktur des Proteins befindlich, zusammen mit den zwei in einer α -Helix eingebetteten Histidinresten tetraedrisch um ein zentrales Zinkatom. Dadurch entsteht die eigentliche fingerartige Struktur, die notwendig ist, um den DNA-Kontakt herzustellen (Párraga *et al.*, 1988; Klevit *et al.*, 1990). Ist einer dieser Zinkfinger in seiner Form beeinträchtigt, oder ist sie sogar vollständig zerstört, so kann die DNA nicht mehr gebunden werden. Für die Allele mit der Mutation an Aminosäureposition 515 bzw. 520 bedeutet das, sie können zwar als Protein noch exprimiert werden, aber sie sind funktionell unwirksam. Die Ergebnisse der Bindungsexperimente (Abbildung 16, Kapitel 3.2.2.1) bestätigen diese Erwar-

tung. Während sich mit dem Wildtyp-Peptid in der Bindungsreaktion ein spezifischer DNA-Peptid-Komplex bildet, der durch Zugabe eines spezifischen Kompetitors beeinflusst wird, entsteht bei den sequenzveränderten Peptiden keine durch Komplexbildung retardierte Bande.

Die Substitution von Arginin (R) durch Glutamin (Q) an Position 625 der Aminosäuresequenz von GLI3 befindet sich im sogenannten C-H-Link des fünften und damit letzten Zinkfingers (siehe Abbildung 15, Kapitel 3.2.2.1). Obwohl der Austausch eine Aminosäure betrifft, die man sowohl bei *GLI1*, *GLI3*, *Cubitus interruptus* von *Drosophila* als auch bei *tra-1* in *C. elegans* hoch konserviert findet (Zarkower *et al.*, 1992; 1993), hat er keinerlei Auswirkung auf die DNA-Bindung. Das mutierte Zinkfingerpeptid zeigt eine Interaktion mit der DNA, die dem Wildtyp vergleichbar ist. Auf Grund des hohen Konservierungsgrades kann man aber davon ausgehen, daß das Arginin an dieser Stelle eine besondere Bedeutung für die Proteinwirkung haben muß und ein Austausch nicht ohne Folgen bleiben sollte. Selbst eine Titration von Wildtyp- und mutiertem Zinkfinger-Peptid mit steigenden Mengen an spezifischem Kompetitor (bis zu 400-fachem Überschuß) zeigte, daß deren Affinität für die Zielsequenzen sehr ähnlich bzw. identisch sind (siehe Abbildung 17, Kapitel 3.2.2.1). Diese Beobachtung ist um so erstaunlicher, da man anhand kristallographischer Aufnahmen der GLI1-DNA-Interaktion feststellen konnte, daß gerade der fünfte Zinkfinger an der direkten DNA-Bindung beteiligt ist. Sowohl dieser, als auch der vierte Zinkfinger stellen den Kontakt zur 9 bp Konsensussequenz her, während Finger 1 keinen DNA-Kontakt hat und die Finger 2 und 3 eine Verbindung zum DNA-Rückgrat herstellen (Pavletich *et al.*, 1993). Eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis wäre ein Unterschied zwischen dem Wildtyp von GLI1 und GLI3 im Kontakt der Zinkfinger mit der DNA, oder auch bei der Interaktion zwischen den Proteinseitenketten und benachbarten Basen. In diesem Fall könnte der DNA-Interaktion des fünften Zinkfingers beim Wildtyp-GLI3 keine so große Bedeutung zukommen und hätte damit auch keinen so entscheidenden Einfluß auf das Bindungsverhalten des mutierten Zinkfingerpeptids. Solche Unterschiede sind bereits bekannt aus Vergleichen von DNA-Protein-Komplexen ähnlicher Faktoren, wie z.B. Zif (Pavletich *et al.*, 1993). Der Wechsel von Arginin zu Glutamin beinhaltet den Austausch einer basischen, positiv geladenen hydrophilen Aminosäure gegen ein ebenfalls hydrophiles, aber ungeladenes Amid der Glutaminsäure. Obwohl es sich um keinen konservativen Austausch handelt, scheint er auf die Interaktionsfähigkeit des Peptids keinen Einfluß zu haben. Das mag daran liegen, daß beide Aminosäuren eine ähnliches

Molekulargewicht besitzen und Amide neben ihrer planaren Struktur, auf Grund der Amid-Doppelbindung, wenig reaktive Verbindungen sind (Hart, 1989), wodurch es weder sterisch noch durch chemische Interferenzen zu einer Einflußnahme kommt. Berücksichtigt werden sollte bei all den Beobachtungen und Vermutungen, daß es sich um Experimente mit einer isolierten DNA-bindenden Domäne handelt. Die zuvor beschriebene Missense-Mutation an Aminosäureposition 625 könnte sich bei Bindungsstudien mit dem gesamten GLI3 Protein durchaus abweichend verhalten. Neben der strukturellen Erklärungsmöglichkeit für das Bindungsverhalten dieser Zinkfinger-Mutante, ist auch eine funktionelle denkbar. Das Arginin an Aminosäureposition 625 ist die erste basische Aminosäure des putativen, zweigeteilten Kernlokalisationssignals (NLS; Abbildung 7, Kapitel 1.4.3; Wang *et al.*, 1999). Obwohl es sich nach der Definition nicht um ein typisches NLS handelt (Boulikas, 1994), so können über Proteinfaltung die beiden Regionen mit der Ansammlung von basischen Aminosäuren in eine räumliche Nähe kommen und somit der klassischen Wirkung einer NLS entsprechen. Die Mutation an der Position 625, die zu einem Austausch der ersten basischen Aminosäure zu Beginn des putativen NLS führt, könnte diese Proteinfaltung und damit die Funktion des Kerntransportes stören. Die phänotypische Konsequenz dieser Sequenzveränderung ließe sich in diesem Fall über eine deregulierte Lokalisation des GLI3-Proteins erklären. Eine Veränderung in der subzellulären Lokalisation des GLI3-Proteins ließe sich möglicherweise über die GLI3-GFP-Fusionsproteine, in die diese Mutation eingebracht würde, aufzeigen.

Eine an der Stelle 1393 der GLI3 cDNA identifizierte Mutation hat die Substitution von Glycin (G) durch Arginin (R) der Aminosäure 465 zur Folge (persönlich Mitteilung T. Attie-Bitach, 1999). Dieser Basenaustausch am Anfang der DNA-bindenden Domäne betrifft weder direkt einen Zinkfinger, noch eine konservierte Aminosäure in diesem Bereich. Die Auswirkung dieser Missense-Mutation auf die DNA-Interaktion war von besonderem Interesse, da es sich um eine Sequenzvariante handelte, die sowohl bei einem Greig Patienten, als auch bei einem unbetroffenen Familienmitglied detektiert worden war. Das heißt, die bisher angenommene komplette Penetranz von GLI3-Sequenzveränderungen wurden durch diesen Befund in Frage gestellt. Von einer Mutation geht man in der Regel aus, wenn die gleiche Sequenzabweichung in 100 Kontrollpersonen nicht zu detektieren ist, was für diesen Austausch an Aminosäureposition 465 zutrifft. Fraglich blieb deshalb, wie die gleiche Mutation bei zwei Personen einmal zur Ausprägung der Erkrankung führte und zum anderen keine phänotypischen Merkmale

hervorrief. Das Ergebnis der Bindungsstudie mit dem mutierten Zinkfingerpeptid brachte keinen Aufschluß bezüglich dieser Fragestellung. Wildtyp- wie mutiertes Zinkfingerpeptid zeigten eine vergleichbare Interaktion mit der DNA, die sich in Form einer retardierten Bande deutlich darstellte (siehe Abbildung 16, Kapitel 3.2.2.1). Das Bindungsverhalten wird durch diese Sequenzveränderung unter unseren Versuchsbedingungen offensichtlich nicht beeinflusst. Nachdem auch das Experiment bezüglich der transkriptionellen Transaktivierung (Daten nicht gezeigt) keine Abweichung im Verhalten zum Wildtyp erbrachte, stellt sich die Frage, ob die Einstufung als phänotypisch relevante Mutation korrekt war. Die Mutationsanalyse bezüglich dieser Veränderung wurde daraufhin bei weiteren 132 Kontrollpersonen durchgeführt. Dabei zeigten sich 4 weitere Personen mit einer Mutation an Aminosäureposition 465. Es muß sich also hier um einen seltenen Polymorphismus handeln (persönliche Mitteilung D. Bornholdt). Für den Greig-Patienten mit diesem Polymorphismus ist damit die genetische Grundlage seiner Erkrankung noch nicht aufgedeckt. Es ist möglich, daß diese GLI3-Variante im Zusammenhang mit einem ebenfalls mutierten Interaktionspartner funktionell bedeutsam ist, oder daß die Funktion des GLI3-Proteins durch eine noch unentdeckte Mutation beeinträchtigt wird.

4.4 Regulation der GLI-DNA-Interaktion außerhalb der Zinkfingerdomäne

Der bei jedem Transkriptionsfaktor vorhandene Sequenzbereich zur spezifischen Bindung der DNA ist sicherlich die wichtigste Komponente, um diese Funktion auszuüben. Allerdings ist bei einem Protein wie GLI3 mit 1580 Aminosäuren leicht vorstellbar, daß diese Aufgabe nicht allein nur durch die 180 Aminosäuren-umfassende Zinkfingerdomäne erfüllt wird. Selbst wenn dieser relativ kleine Proteinbereich als isolierte Domäne ausreicht, um mit Hilfe von Bindungsstudien Aussagen über das Verhalten von Wildtyp und mutierter Zinkfinger-Sequenz treffen zu können, so ist doch der Blick auf das gesamte Protein bedeutsam. Die in Kapitel 4.3 diskutierten *in vitro* Experimente geben einen guten Hinweis darauf, wie das Bindungsverhalten des Proteins durch Mutationen im Zinkfingerbereich beeinflusst werden kann. Daraus resultiert dann eine mögliche Erklärung für den assoziierten Phänotyp. Allerdings ist in einem solch isolierten System, bei dem das DNA-bindende Protein durch ein bakteriell exprimiertes, aufgereinigtes Zinkfinger-Peptid repräsentiert wird, die Einflußnahme zusätzlicher Interaktions-

partner nicht zu testen. Sie könnte aber durchaus ein entscheidender Faktor für die Störung der Proteinfunktion sein. Diese Situation könnte bei der Missense-Mutation an der hochkonservierten Position 625 vorliegen, deren funktionelle Bedeutung bisher nicht geklärt werden konnte. Daß zusätzliche Interaktionspartner sehr wohl eine Rolle bei DNA-Bindung von GLI-Proteinen spielen, wurde durch die Entdeckung des Vertebraten- bzw. Säugerhomologs von *suppressor of fused* (*dsu(fu)*) aus *Drosophila* deutlich. Es handelt sich bei *dsu(fu)* um ein Protein der Hedgehogkaskade, welches innerhalb des zytoplasmatischen Komplexes an *cubitus interruptus* (*ci*) und die Kinase *fused* (*fu*) bindet und dadurch Einfluß auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors nimmt (Wang *et al.*, 2000a). Ein ähnlicher Mechanismus wird auch für das humane SU(FU) vermutet, das sich sowohl im Zytoplasma als auch im Kern einer Zelle befindet. Es bindet an die Homologiedomäne 1 der GLI-Proteine, wodurch der Kerntransport des Transkriptionsfaktors verhindert wird (Murone *et al.*, 2000). Befindet sich GLI3 bzw. GLI1 bereits im Zellkern, so findet auch hier eine Interaktion mit SU(FU) statt, allerdings nur dann, wenn die GLI-Proteine bereits an die DNA gebunden sind. Mit Hilfe von Gelretardierungsexperimenten konnte dabei gezeigt werden, daß die Bindung zwischen DNA und dem GLI1- bzw. GLI3-Protein durch Anwesenheit von SU(FU) an Intensität zunimmt (Pearse II *et al.*, 1999). Über die Bedeutung dieser Beobachtung kann bisher nur spekuliert werden, da der Suppressor of fused grundsätzlich eher eine negativ regulatorische Wirkung auf die Hedgehog-Signalkaskade hat. Eindeutig allerdings ist, daß die DNA-bindenden Eigenschaften der GLI-Proteine durch die Interaktion mit mindestens einem Faktor moduliert wird (Pearse II *et al.*, 1999; Kogerman *et al.*, 1999). Dieser wäre ein Kandidat, der im Zusammenwirken mit der GLI3-Mutante R625Q der Greig-Phänotyp bewirken könnte, falls das Protein verändert ist.

4.5 Die GLI-Transkriptionsfaktoren und ihre Aktivierungs- bzw. Repressionsfähigkeit

4.5.1 TA₁ (Transaktivierende Domäne 1) in GLI3 ist trotz der Mutation S1526G unverändert aktiv

Die transaktivierende Wirkung isolierter, C-terminaler GLI3 Domänen konnte bereits in früheren Experimenten gezeigt werden. Dai und Mitarbeiter grenzten 1999 eine Domä-

ne mit aktivierender Wirkung über GAL4-GLI3-Fusionskonstrukte ein. Sie überlagert den CBP-Bindungsereich von GLI3, der innerhalb der Aminosäuren 827 bis 1132 liegt. Dieser Sequenzbereich, isoliert fusioniert mit der GAL4-Bindungsdomäne, hat eine aktivierende Wirkung auf das eingesetzte Reporterogen. Mit Hilfe eines ähnlichen GAL4-Systems gelang es im gleichen Jahr, die transaktivierende Kapazität von GLI3 auf zwei unabhängige Sequenzbereiche TA₁ (Aminosäuren 1376 bis 1580) und TA₂ (Aminosäuren 1044 bis 1322), die mit dem CBP-Bindungsereich in der Region der Aminosäuren 1044 bis 1132 überlappt, festzulegen (siehe auch Abbildung 7 in Kapitel 1.4.3). Jede dieser Domänen besitzt für sich eine transaktivierende Wirkung, die einen Summationseffekt zeigt, wenn beide Bereiche zusammen an die DNA-bindende Domäne des Hefetranskriptionsfaktors gekoppelt werden (siehe Abbildung 18, Kapitel 3.3.1; Kalff-Suske *et al.*, 1999).

Der über Einzelstrangkonnformationsanalyse in einem GCPS-Patienten detektierte Basenaustausch von A zu G an Position 4576 führt zu einem Austausch von Serin (S) nach Glycin (G) an Position 1526 der Aminosäurekette. Diese Sequenzänderung befindet sich innerhalb von TA₁, in unmittelbarer Nähe der Homologiedomäne 7 (siehe Abbildung 8, Kapitel 1.5.1). Für diesen Bereich saurer Aminosäuren wird die Bildung einer amphipatische Helix postuliert, die oft eine transaktivierende Wirkung besitzt (Ruppert *et al.*, 1990). Aus diesem Grund war es von besonderem Interesse, diese Missense-Mutation über gerichtete Mutagenese in die GAL4-GLI3-Fusionskonstrukte einzubringen, die entweder die transaktivierende Domäne 1, oder TA₁ und TA₂ enthalten, um sie auf ihre Wirkung zu testen. Bei beiden Konstrukten ist im Vergleich zur unveränderten Variante (Wildtyp) eine unveränderte transaktivierende Aktivität festzustellen (Abbildung 18; Kapitel 3.3.1). Die Abweichungen innerhalb des Ergebnisse von Wildtyp- und mutiertem GAL4-GLI3¹³⁷⁶⁻¹⁵⁸⁰ Fusionskonstrukt relativieren sich unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Der Aminosäureaustausch bei 1526 beeinflusst die GLI3-Proteinfunktion bezüglich der Transaktivierung in diesem Testsystem also nicht. Eine Beobachtung, die auch in anderen Empfängerzelllinien bestätigt wurde (Osteosarcomazelllinie U2-OS). Die Konstrukte GAL4-Sp1A und GAL4-GLI3¹⁰⁴⁴⁻¹³²² wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Für den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Sp1 ist eine aktivierende Wirkung in diesem Testsystem bereits publiziert, so daß er als interne Kontrolle bei jeder Versuchsdurchführung eingesetzt wurde (Hagen *et al.*, 1994; 1995). GAL4-GLI3¹⁰⁴⁴⁻¹³²² enthält die transaktivierende Domäne 2 des GLI3-Proteins, und auch hier ist eine Aktivierung des Reporterogens bereits bekannt, so daß man dieses

Konstrukt als eine proteinspezifische Positivkontrolle nutzen kann (Kalff-Suske *et al.*, 1999). Nur wenn beide Expressionsplasmide die erwartete aktivierende Wirkung zeigen, geht man von einem korrekten Versuchsablauf aus. Obwohl es sich hier um ein artifizielles System handelt, bei dem die DNA-bindende Domäne von GAL4 für die spezifische Interaktion mit dem Reporter genutzt wurde, eignet es sich, um damit die aktivierende Wirkung von GLI3 oder von GLI3-Mutanten zu testen.

Für den Patienten, der diese Mutation im *GLI3*-Gen trägt blieb damit die Frage offen, ob es sich um eine Phänotyp-verursachende Sequenzänderung handelt. Um dieser Frage nachgehen zu können, wurden zusätzlich, erst zu einem späteren Zeitpunkt erhaltene DNA-Proben anderer Familienmitglieder mittels SSCA auf Sequenzveränderungen hin getestet. Bei dieser erweiterten Analyse stellte sich heraus, daß zwei weitere betroffene Mitglieder dieser Familie weder den oben beschriebenen, noch einen anderen durch SSCA zu detektierenden Aminosäureaustausch in ihrem *GLI3*-Gen trugen (persönliche Mitteilung D. Bornholdt). Vor dem Hintergrund der nicht nachzuweisenden funktionellen Beeinträchtigung des GLI3-Proteins durch die Mutation deutet dieser Befund an, daß in dieser Familie die ursächliche Mutation noch nicht gefunden wurde.

4.5.2 Transkriptionelle Aktivität von GLI1- bzw. GLI3-Wildtypprotein und ausgewählten GLI3-Mutanten

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, konnte die Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung durch zwei unabhängige, C-terminal gelegene Domänen von GLI3 mit Hilfe von GLI3-Fusionen an die GAL4-Bindungsdomäne und einem GAL4-abhängigen Reporter detektiert werden (Kalff-Suske *et al.*, 1999). Diese potentielle Aktivierungsfähigkeit sollte für Wildtyp-GLI3 im Vergleich mit GLI1 an einem unabhängigen Reportersystem getestet werden, das von Sasaki 1997 erstmals beschrieben worden war. Die Wirkung des eukaryontisch exprimierten GLI1- bzw. GLI3-Proteins wurde über ein Reportergenkonstrukt ermittelt, welches einen artifizialen Promotor mit 8 hintereinander geschalteten GLI-Bindungsstellen enthielt. Sasaki bzw. Wang und Mitarbeiter hatten gezeigt, daß GLI1 in der Lage ist, das enthaltene Reportergen konzentrationsabhängig zu aktivieren, bis ein Sättigungsverhalten auftritt. GLI3 hingegen zeigte als Gesamtprotein keine Wirkung. Wir konnten diesen Befund mit einem Luciferase-Reporter gen in mehreren Zelllinien bestätigen. Es ließ sich sogar eher eine konzentrationsabhängige

Repression feststellen, denn mit Zunahme der Menge des transfizierten GLI3-Expressionskonstruktes ging die gemessene Luciferaseaktivität zurück (siehe Abbildung 19 und 20; Kapitel 3.3.2). Diese Tendenz im Verhalten des Reportergens war unabhängig davon, ob die verwendete Zelllinie endogen GLI-Proteine exprimiert oder nicht. Sowohl die Osteosarcomazelllinie U2-OS, die endogen GLI-Proteine enthält (über Gelretardierungsexperimente ermittelt; Daten nicht gezeigt), als auch die GLI-negativen NCI-H441 Zellen zeigten eine GLI1-vermittelte Aktivierung bzw. eine GLI3-vermittelte Repression des Reportergens. Daß es sich bei diesen Beobachtungen um eine spezifische Interaktion mit den GLI-Bindungsstellen handelt, wurde mit einem Reportergenkonstrukt, welches 8 Kopien einer mutierten GLI-Bindungsstelle enthält, anhand des völligen Zusammenbruchs der Reportergenaktivität dokumentiert (siehe Abbildung 19). Die hier aufgeführten Beobachtungen stimmen mit den Daten aus der Literatur überein, die das identische Reportergenkonstrukt, allerdings andere Zelllinien verwendeten (Sasaki *et al.*, 1997; 1999; Wang *et al.*, 2000b). Abweichende Ergebnisse zeigten sich bei Transfektionsexperimenten, in denen die Mauszelllinie NIH3T3 mit einem Reportergenkonstrukt transfiziert wurden, in dem das Indikatorprotein, die bakterielle Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT), über einen Reporter mit 6 Tandemkopien der GLI-Bindungssequenzen reguliert wurde. Die transaktivierende Wirkung des gesamten GLI3-Proteins ist in diesem System in der Lage, das Reportergen konzentrationsabhängig zu aktivieren (Dai *et al.*, 1999). Diese Abweichungen bezüglich der GLI3-Proteinwirkung lassen sich auf unterschiedliche Weise erklären. Zum einen muß sichergestellt sein, daß durch das transfizierte Expressionskonstrukt auch jeweils das spezifische Protein gebildet wird, durch dessen Anwesenheit eine Wirkung auf den Reporter möglich ist. In der Arbeit von Dai und Mitarbeitern wurde dieser Nachweis nicht erbracht und in der vorliegenden Arbeit bestenfalls qualitativ über die inhibitorische Wirkung von GLI3 auf eine GLI1-vermittelte Transaktivierung bei Kotransfektionsexperimenten (Abbildung 21; Kapitel 3.3.3). Außerdem kann der Einsatz unterschiedlicher Zelllinien, abhängig von ihrer endogenen Proteinausstattung zur Modulation der Reportergenaktivität führen. Nicht zuletzt sind die Verwendung außergewöhnlich hoher DNA-Mengen und die unterschiedliche Reportergenkonstruktion Gründe für die abweichende Resultate dieser Transfektionsexperimente. Von anderen Transkriptionsfaktoren ist bekannt, daß für die Aktivierung des Reporters allein die Anzahl enthaltener Bindungsstellen entscheidend sein kann (Dennig *et al.*, 1996). All diese das Ergebnis beeinflussenden Faktoren machen deutlich, daß die durchgeführten Experimente immer nur

einen bestimmten Teilaspekt einer Gesamtsituation widerspiegeln können. Dadurch wird die Übertragung der generierten Daten auf eine *in vivo* Situation sehr diffizil. Für die hier gegebene Situation bezüglich des GLI3 Proteins heißt das, dieses Protein hat sowohl die Fähigkeit eine repressorische, als auch eine aktivierende Funktion zu übernehmen. Abhängig von der zellulären Umgebung in der es sich befindet, kann dann entweder die eine oder andere Wirkung bevorzugt vorhanden sein.

Das oben beschriebene Reportergensystem wurde verwendet, um die Transaktivierungseigenschaften von gefundenen GLI3-Mutationen in GCPS-Fällen funktionell zu testen. Bei den nicht trunkierenden Mutationen (Missense-Mutationen) handelte es sich um Sequenzveränderungen, die im Kollektiv der GCPS-Patienten detektiert und über gerichtete Mutagenese in das GLI3-Expressionskonstrukt eingebracht worden waren. Weder der Aminosäureaustausch von Glycin (G) zu Arginin (R) an Position 727 der Polypeptidkette, noch die Deletion der einzelnen Aminosäure Glutamin (Q) an Position 926 führten zu einer Veränderung in der GLI3-Proteinwirkung, das heißt, es kam zu keinem konzentrationsabhängigen Anstieg der Reportergenaktivität, wie bereits beim GLI3-Wildtyp (Abbildung 20; Kapitel 3.3.2). Die Mutationen G727R und Q926del scheinen offensichtlich nicht die Transaktivierungseigenschaften zu beeinflussen.

Dieser Befund war nicht völlig unerwartet, da für den N-Terminus des GLI3-Proteins bereits eine repressorische Funktion postuliert wurde (Sasaki *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000b). Um diese repressorische Wirkung im vor Ort entwickelten Transaktivierungsassay zu testen, wurde ein Expressionskonstrukt generiert, dem die ersten 427 Aminosäuren des GLI3-Proteins bis vor der Zinkfinger-Domäne fehlen. Selbst diese N-terminal deletierte GLI3-Form ist nicht in der Lage, das Reportergen zu aktivieren, obwohl die DNA-bindende Domäne unverändert enthalten ist und der putative repressorische Anteil entfernt wurde (siehe Abbildung 20). Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu den in der Literatur vorhandenen Daten, die eine "schwach" aktivierende Wirkung von N-terminal deletierten GLI3-Proteinen zeigen (Dai *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 1999). Diese Diskrepanz könnte sowohl auf undokumentierten Unterschieden im Expressionslevel des Proteins, als auch auf dem Reportergenkonstrukt bzw. auf den verwendeten Zelllinie beruhen. Das heißt, die repressorische Wirkung des N-Terminus von GLI3 kann nicht ausgeschlossen werden, auch wenn sie an dieser Stelle nicht bestätigt werden konnte, weil das N-terminal deletierte GLI3-Protein keine aktivierende Wirkung auf den Reporter hatte.

4.5.3 **Kompetition der GLI-Proteine um gleiche Reporter-gen bindungsstellen**

Expressionsstudien der homologen GLI-Proteine in Modellorganismen wie Maus und Hühnchen haben gezeigt, dass alle drei Familienmitglieder in zum Teil überlappenden Regionen exprimiert werden. Bei der gleichzeitigen Anwesenheit dieser Proteine innerhalb einer Zelle führt das zu einer Konkurrenz um die vorhandenen Bindungsstellen der Zielgene, so daß sich die GLI-Proteine in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen (Mo *et al.*, 1997; Motoyama *et al.*, 1998; Büscher *et al.*, 1998; Ruiz i Altaba 1999; Schweizer *et al.*, 2000). Eine Interaktion ganz besonderer Art ergibt sich durch die Anwesenheit von 8 putativen GLI-Bindungsstellen innerhalb der mehrere kb langen Maus-GLI1-5' Kontrollregion. In der Tat vermittelt dieser Bereich eine schwache Aktivierung in Kotransfektionsexperimenten mit GLI3 (Park *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 1999). Das bedeutet, die GLI Proteine können nicht nur mit den gleichen Zielgenen interagieren, weil diese die entsprechende Konsensussequenz in ihrer Promotorregion enthalten, sondern sie haben auch untereinander einen gegenseitigen regulatorischen Einfluß. Obwohl diese Daten durch Experimente mit murinen Proteinen generiert wurden, kann man auf Grund der hohen Homologie davon ausgehen, daß im humanen System eine ähnliche Situation vorliegt. So ist z.B. die Promotorregion des humanen *GLI1*-Gens in der Lage, die GLI1-Expression in der Maus zu regulieren (Liu *et al.*, 1998). Außerdem können humane GLI-Proteine in transgenen *Drosophila* Linien die Funktionen ihres Homologes *cubitus interruptus* (*ci*) übernehmen. Sie erhalten durch diese transgene Expression mit *ci* vergleichbare Aktivitäten (Liu *et al.*, 1998; von Mehring *et al.*, 1999; Aza-Blanc *et al.*, 2000). Diese doch erstaunliche Übertragbarkeit von Proteinfunktionen über Speziesgrenzen hinweg zeigt, wie sehr diese Proteine und ihre beteiligten Signalkaskaden während der Evolution konserviert wurden. Eine überlappende Expression von murinen GLI-Proteinen in definierten Regionen und zu einem definierten Zeitpunkt der Entwicklungsgeschichte läßt deshalb den Schluß zu, daß ähnliches auch für die Embryogenese des Menschen gelten kann. Aus dieser Situation ergibt sich die Frage, wie humanes GLI1 und GLI3 miteinander interagieren, wenn sie gleichzeitig in einem Zellsystem vorhanden sind. Getestet wurde dies mit Hilfe eines Wettbewerbsassays, bei dem die GLI1- und GLI3-Expressionskonstrukte gleichzeitig transfiziert werden. Neben dem GLI3-Wildtypprotein wurden auch die an Aminosäureposition 727 bzw. 926 der Polypeptidkette mutierten Proteine, sowie die Zinkfingermutante C515G und ein N-terminal

deletierte GLI3-Protein getestet. Ihr Einfluß auf die durch eine konstante Menge an GLI1-Expressionsplasmid vermittelte Aktivierung des Reportergens konnte nach Kotransfektion über die Luciferaseaktivität detektiert werden. Sowohl die Expression des GLI3-Wildtyp, als auch die der an Position 727 bzw. 926 mutierten Proteine bewirkte eine Reduktion der GLI1-vermittelten Aktivierung auf ein Drittel bis ein Fünftel der Ausgangsaktivität. GLI3 hat offensichtlich eine reprimierende Wirkung auf GLI1 (siehe Abbildung 21, Kapitel 3.3.3). Eine von der Expressionsplasmidkonzentration abhängige inhibitorische Wirkung des GLI3-Proteins auf die durch das GLI1-Protein vermittelte Aktivierung eines Reportergens konnte auch in von Gliedmaßenknospen des Hühnchens abstammenden primären Zellen gezeigt werden (Wang *et al.*, 2000b). Die naheliegendste Annahme ist, daß eine Besetzung der GLI-Bindungsstellen des Reporters durch GLI3 erfolgt, wodurch weniger GLI1 binden und entsprechend aktivieren kann. Andererseits könnte GLI3 eine aktive, repressorische Wirkung, die nicht über die, den GLI-Proteinen gemeinsamen DNA-Bindungsstellen stattfindet, ausüben, und so den Rückgang der GLI1-vermittelten Aktivierung bewirken. Im Gegensatz zu den obigen GLI3-Mutanten bewirkt die Zinkfingermutante C515G, deren zerstörte DNA-Bindungsfähigkeit in Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden konnte, nur einen minimalen Rückgang der GLI1-Aktivität im Kotransfektionsexperiment. Der 20%ige Rückgang der GLI1-Ausgangsaktivität (wenn im Vergleich zu GLI1 die 4-fache Menge von GLI3-Expressionsplasmid eingesetzt wird) kann auf Expressionsunterschiede von GLI3-Wildtyp und Punktmutanten zurückzuführen sein. Neben den möglichen Expressionsunterschiede, wären aber auch andere Erklärungsmöglichkeiten denkbar. Da die DNA-Bindung durch das mutierte Zinkfingerprotein nachweislich nicht mehr möglich ist, stellt sich die Frage, wie es trotzdem zu einer Kooperation zwischen den beiden GLI-Proteinen bezüglich der Bindungsstellen kommen kann. Der Rückgang der Luciferaseaktivität um ca. ein Fünftel des Ausgangswertes könnte auf einer von der DNA-Bindung unabhängigen Interaktion zwischen den GLI-Proteinen beruhen, die erst bei einer solchen Koexpression nachweisbar wird und zur Reduktion der GLI1 vermittelten Transaktivierung des Reportergens führt. Das aminoterminal um 427 Aminosäuren verkürzten GLI3-Expressionkonstrukt beeinträchtigt die GLI1-vermittelte Reporterinduktion nicht (siehe Abbildung 21, Kapitel 3.3.3). Obwohl diese GLI3-Deletionsmutante ihre Zinkfinger-Domäne noch unverändert enthält und damit auch in der Lage sein sollte, DNA zu binden, zeigt sie keine reprimierende Wirkung auf GLI1. Vorstellbar wäre, daß die Verkürzung des GLI3-Proteins einen Einfluß auf die Bin-

dungsaffinität nimmt, wodurch in Konkurrenz mit GLI1 das mutierte Protein weniger gut binden kann und damit keinen Einfluß auf die GLI1-vermittelte Aktivierung hat. Grundsätzlich können sowohl intrinsische Faktoren des Wildtyp- bzw. des N-terminal verkürzten Proteins, als auch äußere Faktoren, die eine Proteinmodifikation von bestimmten Bereichen vermitteln, die Bindungsaffinität beeinflussen. Unter Berücksichtigung dieser Datenlage, sowie der anderer Gruppen (Sasaki *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000b), die eine repressorische Domäne im N-Terminus von GLI3 postuliert, ist das ermittelte Resultat auch anders zu interpretieren. Das aminoterminal verkürzte GLI3-Protein ist durchaus noch in der Lage, mit den GLI-Bindungssequenzen des Reporters zu interagieren und konkurriert deshalb mit dem GLI1-Protein um die vorhandenen Bindungsstellen. Durch seine nicht mehr vorhandene Repressionsdomäne findet aber keine inhibitorische Wirkung auf die durch das GLI1-Protein induzierte Aktivierung statt. Der geringere Anteil an gebundenem, aktivierendem Protein müßte dann zu einer Abnahme bei der Luciferaseaktivität führen. Da dies aber nicht beobachtet wird, muß das N-terminal verkürzte GLI3-Protein ebenfalls aktivieren. Das heißt, die alleinige Anwesenheit der N-terminalen GLI3-Deletionsmutante ist nicht ausreichend, um das Reportergen zu aktivieren, aber zusammen mit dem GLI1-Protein ist dies in Form einer Summationswirkung möglich. Eine weitere mögliche Erklärung für die ermittelten Ergebnisse wäre die von der DNA-Interaktion unabhängig vermittelte Wirkung des um die Repressionsdomäne verkürzten GLI3 Proteins. Welche der angegebenen, oder ob zusätzliche Erklärungen zutreffen, könnte durch weitere Studien aufgedeckt werden. Bei diesen könnte z.B. eine hypothetische Modifikation des N-Terminus erkundet werden, oder die DNA-Bindungseigenschaften von N-terminal deletierten GLI3-Proteinen mit und ohne Modifikation. Ist das GLI3-Deletionskonstrukt tatsächlich in der Lage, in gleicher Weise wie GLI1 mit der DNA zu interagieren, so muß der Verlust der repressorischen Domäne mit einem Gewinn an aktivierendem Potential einhergehen.

4.5.4 Im GLI3 N-Terminus konservierte Sequenzbereiche könnten eine funktionelle Bedeutung haben

Bei der Sequenzanalyse des Aminoterminus von GLI3 fielen konservierte Bereiche auf, die der Konsensussequenz für Sentrinization (IL)**K(Q/T)**E, auch Sumoylierung genannt, entsprachen. Es handelt sich hierbei um Sequenzbereiche, die zur posttranslatio-

nenalen Modifikation von Proteinen verwendet werden. Diese Proteinumgestaltung findet über eine der Ubiquitin-vermittelten Proteinumgestaltung ähnlichen Reaktionskaskade statt, aber mit völlig anderen Auswirkungen, z.B. bei PML. PML ist ein RING-Finger Protein, das mit der Pathogenese der Akuten Promyelozytenleukämie assoziiert ist (Melnich *et al.*, 1999) und dessen subzelluläre Lokalisation wird über die Sentrinization des Proteins bestimmt (Boddy *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1996). Außerdem kann diese Modifikation die transaktivierende Aktivität eines Proteins verstärken (z.B. von dem Tumorsuppressorgen p53), oder den Ubiquitin-vermittelten Abbau eines Proteins verhindern (z.B. von I κ B α , dem zytosolischen Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF κ B; Yeh *et al.*, 2000). Für GLI3 bedeutet die Anwesenheit von sechs putativen Sumoylierungsstellen im N-Terminus, die teilweise innerhalb der GLI-Proteinfamilie hoch konserviert sind, daß eine solche Modifikation eine Regulation vielfältigster Art ausüben könnte. Ein Beispiel dafür, daß die Konsensussequenz der Sentrinisation direkt mit einer Transkriptionsfaktorfunktion in Zusammenhang gebracht werden kann, ist Sp3. Dieser Faktor ist das inhibitorische Mitglied der Zinkfingerproteinfamilie mit zwei Glutamin-reichen Aktivierungsdomänen vor dem DNA-bindenden Bereich (Hagen *et al.*, 1992; Dennig *et al.*, 1994). Fusioniert an eine GAL4-Bindungsdomäne zeigen die Glutamin-reichen Bereiche eine transaktivierende Wirkung, die bei der Fusion von GAL4 mit dem Sp3-Protein, dem nur die eigene DNA-Bindungsdomäne fehlt, nicht mehr zu detektieren ist. Es muß also eine inhibitorische Domäne innerhalb des Transkriptionsfaktors geben, deren Funktion die Wirkung der aktivierenden Domänen überlagern kann und die bei Sp1, dem aktivierenden Mitglied dieser Familie, nicht vorhanden sein sollte. Sequenzvergleiche unter den Familienmitgliedern und die Generierung von Sp3-Deletionskonstrukten, bei denen die Sp-Bindungsdomäne des Proteins mit der spezifischen Sp-Bindungssequenz getestet wurde, brachten eine stark geladene Region von 13 Aminosäuren in das Zentrum des Interesses. Innerhalb dieser Region befindet sich eine Konsensussequenz für Sentrinization (KEE bei Aminosäureposition 423-425). Werden der Lysin- (K) und die beiden Glutaminsäurereste (E) über gerichtete Mutagenese durch Alanine (A) ersetzt, so verwandelt sich das Sp3-Protein in einen Aktivator. Das KEE-Triplett wird offensichtlich benötigt, um die transaktivierende Wirkung des Proteins ruhig zu stellen (Dennig *et al.*, 1996). Ob das KEE-Motiv von Sp3 tatsächlich Substrat für eine Modifikation durch Sumoylierung ist, wird derzeit untersucht (persönliche Mitteilung G. Suske).

Sp3 ist ähnlich wie GLI3, das inhibitorisch wirkenden Mitglied einer Transkriptionsfaktorfamilie. Auf Grund der funktionellen (zwei unabhängige Aktivierungsdomänen, die im Gesamtprotein offensichtlich ihre Funktion nicht ausüben können) und strukturellen (Transkriptionsfaktor vom Zinkfingertyp) Gemeinsamkeiten zwischen diesen Faktoren stellt sich die Frage, ob den sechs Konsensusbereichen der Sentrinization innerhalb des N-Terminus von GLI3 eine Bedeutung zukommt. Der schrittweise Austausch einzelner Motive über gerichtete Mutagenese müßte dann zur Umwandlung der repressorischen in eine aktivierende Wirkung von GLI3 führen.

Das N-terminale Deletionskonstrukt von GLI3 ist um die ersten 427 Aminosäuren verkürzt und enthält aus diesem Grund die ersten beiden Sentrinizations-Konsensussequenzen (aa 15-17, aa 86-88) nicht. Nachdem dieses Protein, wie im vorangegangenen Kapitel erörtert, nicht in der Lage ist, ein Reporter gen zu aktivieren, könnten diesen beiden ersten Konsensussequenzen eine Repressorfunktion zukommen. Ob diese Wirkung auf Grund der enthaltenen Konsensussequenzen für Sumoylierung auftritt, muß noch anhand gezielter Mutagenese dieser Motive geprüft werden. Allerdings ist die Abwesenheit allein nicht ausreichend für eine Aktivierung. Als nächstes wurde das KEE- (aa 462-464) bzw. KDE-Motiv (aa 467-469) einzeln durch Alanine ersetzt und diese mutierten Konstrukte dann auf ihre Transaktivierungsfähigkeit getestet. Aber weder sie, noch die nachfolgend generierte KEE+KDE-Doppelmutante waren in der Lage, die Luciferaseaktivität zu erhöhen. Ihr Einfluß auf das Reporter gen ist dem des GLI3-Wildtypproteins vergleichbar (siehe Abbildung 22, Kapitel 3.3.4). Das bedeutet, auch diese beiden putativen Sentrinizationsstellen sind weder einzeln noch gemeinsam in der Lage, die repressorische Wirkung von GLI3 aufzuheben und es in einen Aktivator zu verwandeln. Die Analyse dieser drei Expressionskonstrukte im Kompetitionsassay zeigte ein erstaunliches Ergebnis. Die beiden Einzelmutanten hatten auch hier, wie das Wildtypprotein, einen Rückgang der GLI1-vermittelten Luciferaseaktivität zur Folge. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung war nur noch ein Drittel bis maximal die Hälfte der Ausgangsaktivität zu detektieren. Die in das GLI3-Expressionsplasmid eingebrachte Doppelmutante KEE+KDE bewirkte eine überaus starke Repression der durch das GLI1-Protein induzierten Reporter genaktivität, die vier- bis achtfach stärker war, als durch die jeweiligen Einzelmutanten. Durch den Verlust dieser beiden Motive an Aminosäureposition 462-464 und 467-469 wird das GLI3-Protein nicht zu einem Aktivator, sondern es gewinnt eine noch stärkere Repressionsfähigkeit auf die GLI1-vermittelte Transaktivierung. Eine mögliche Erklärung für diese

Zunahme ist eventuell eine veränderte DNA-Bindungsaffinität, die nicht zwangsläufig mit einer Sentrinization in Verbindung zu bringen ist. Die GLI3-Doppelmutante kann vielleicht die GLI-Konsensussequenz des Reportergenkonstruktes im Vergleich zu GLI1 wesentlich effektiver binden, so daß dessen aktivierende Wirkung nicht zum tragen kommt. Eine Beeinflussung des Bindungsverhaltens erscheint wahrscheinlich, da sich die mutierten Bereiche bereits innerhalb der GLI3-Zinkfingerdomäne befinden. Allerdings ist dieser Einfluß möglicherweise auch allein auf die veränderten Aminosäuren zurückzuführen, die das Bindungsverhalten beeinflussen und nicht mit der nun nicht mehr möglichen Modifikation dieser Domänen in Verbindung zu bringen. Bindungsassays mit diesem doppelt mutierten Protein könnten Aufschluß darüber bringen, ob tatsächlich eine Beeinflussung dieser GLI3-Funktion vorliegt, oder ob die verstärkte repressorische Wirkung anderweitig begründet ist.

Die letzten beiden Konsensusbereiche einer möglichen Sumoylierung an Position 471-473 und 510-512 müssen durch gerichtete Mutagenese noch verändert werden, um ihren Einfluß auf das GLI3 Protein zu testen. Erst wenn die Auswirkungen aller einzeln und in Summation veränderten Sequenzmotive ermittelt wurden, läßt sich eine endgültige Aussage über die Bedeutung dieser Bereiche ermitteln. Ein mögliches Aktivierungspotential von GLI3, welches durch alle Sentrinizationsdomänen gemeinsam negativ beeinflusst wird, könnte nach ihrer Veränderung zu Tage treten. Hinweise darauf, daß erst die Mutation aller Motive zu einer Veränderung in der Proteinfunktion führen, sind bereits in der Literatur durch das Beispiel des PML RING-Finger-Proteins bekannt (Yeh *et al.*, 2000).

4.5.5 Wirkung von exprimierten GLI Proteinen nach transienter Transfektion auf einen natürlichen Promotor

Bei den bisher beschriebenen Transaktivierungsstudien wurde jeweils die Wirkung von exprimierten GLI-Proteinen auf ein Reportergenkonstrukt beschrieben, welches multimerisierte GLI-Konsensussequenzen als Promotorregion (acht tandemartig hintereinander geschaltete GLI-Bindungsstellen) vor dem Luciferasegen enthielt. Da eine solche artifizielle Bindungsregion kaum mit einer natürlichen vergleichbar ist, bleiben die ermittelten Transaktivierungsergebnisse für Rückschlüsse auf ein *in vivo* Verhalten der Proteine problematisch. Allerdings konnten auch innerhalb natürlicher Promotorbereiche multimerisierte GLI-Bindungsstellen detektiert werden. So enthält das patched (*ptc*)

Protein von *Drosophila* drei hintereinander geschaltete GLI-Konsensus-Bindungsstellen und die Promotorregion des humane *PTCH1*-Gens zwei hochkonservierte, putative GLI-Bindungsstellen (Alexandre *et al.*, 1996; Kogerman *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1999). Selbst der Promotor des murinen GLI1-Proteins besitzt acht Bindungsstellen (Dai *et al.*, 1999). Welche der einzelnen Konsensussequenzen funktionell von Bedeutung sind, ist derzeit nicht bekannt. Vorstellbar aber ist, daß eine Aneinanderreihung von Konsensussequenzen eine zusätzliche Genregulationsmöglichkeit bietet, bei der der Schwellenwert bis zur Aktivierung des einzelnen Gens mit der Anzahl der Bindungsstellen variiert.

Um eine größere Annäherung an die natürlichen Bedingungen zu erreichen, wurde die 5' regulatorische Region des humanen *PTCH1*-Gens in ein Reporter-genkonstrukt kloniert. Sie enthält zwei hochkonservierte GLI-Bindungsstellen und wurde als Promotor vor das Reporter-gen Luciferase kloniert. Da es sich bei *PTCH1* um ein durch die GLI-Proteine reguliertes Gen handelt, erscheint dessen Promotorregion geeignet, die transaktivierenden Kapazitäten von GLI1 und GLI3 zu testen (Büscher *et al.*, 1997; von Mehring *et al.*, 1999; Aza-Blanc *et al.*, 2000). Expressionskonstrukte, die die Wildtypsequenz von GLI1 bzw. GLI3, oder aber mutierte GLI3-Sequenzen beinhalten, wurden mit dem Reporter-gen koexprimiert. Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen bewirkt das GLI1-Protein hier eher einen konzentrationsabhängigen Rückgang einer ohnehin schwachen Luciferaseaktivität. Die nicht zu detektierende Aktivierung des Reporter-gens durch GLI1, ist möglicherweise auf die Anwesenheit von Erkennungssequenzen für zusätzliche Faktoren in der *PTCH1*-Kontrollregion zurückzuführen.

Die transaktivierende Wirkung von GLI3 ist der vergleichbar, die durch den Expressionsvektor ohne Insert induziert wird. Dieses Konstrukt resultiert nicht in einer Proteinexpression, so daß die hier ermittelten Luciferasewerte als unspezifische Basisaktivierung gesehen werden müssen. Sowohl das Wildtyp als auch die mutierten GLI3-Proteine (N-terminales Deletionskonstrukt und Zinkfinger-Mutante C515G) bewirken eine konzentrationsunabhängige Reporteraktivierung um diesen Basiswert, so daß nicht von einer Bindungsstellen-spezifischen Wirkung ausgegangen werden kann. Bei Kotransfektionen von humanem GLI3-Wildtyp mit einem murinen GLI1-Promotor-konstrukt kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung des Reporters in der Mauszelllinie NIH3T3 (Dai *et al.*, 1999). Selbst bei Experimenten mit dem bereits oben beschriebenen humanen *PTCH1*-Reporter-genkonstrukt ist eine konzentrationsabhängige, GLI3-vermittelte Zunahme der Luciferaseaktivität in der humanen, embryonalen Nierenzelllinie 293 zu detektieren (Shin *et al.*, 1999). Bei diesen Experimenten, die

erstmals ein positives Aktivierungspotential von GLI3 zeigten, handelt es sich aber um relativ geringe, maximal 2- bzw. 4-fach Effekte. Die aktivierende Wirkung von GLI1 sowohl auf Reportergenkonstrukte mit artifiziellen wie auch natürlichen Bindungsstellen konnte bereits gezeigt werden (Sasaki *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 1999; Kogerman *et al.*, 1999). Die zu den hier ermittelten Resultaten unterschiedlichen Ergebnisse von Shin und Mitarbeitern beim Einsatz des gleichen *PTCH1*-Reportergenkonstruktes können beispielsweise durch die unterschiedlichen Zelllinien erklärt werden, mit denen die Experimente durchgeführt wurden. Grundsätzlich kann aber das GLI3-Protein in Transaktivierungsassays sowohl eine aktivierende wie auch reprimierende Wirkung ausüben. Beide vorhandenen Funktionen können je nach Reporterkonstrukt und verwendeter Zelllinie experimentell detektiert werden. Das bedeutet, beide Wirkungsweisen sind auch in der natürlichen Umgebung dieses Proteins denkbar und ihre Ausprägung in die eine oder andere Richtung kann durch zusätzliche Bedingungen im Umfeld bestimmt werden.

4.6 Die subzelluläre Lokalisation von GLI3

4.6.1 Die subzelluläre Verteilung von *cubitus interruptus* als Modell für GLI3?

Die großen Übereinstimmungen der Sequenz der humanen GLI-Proteine mit ihrem Homolog in *Drosophila*, *cubitus interruptus* (*ci*), sprechen dafür, daß innerhalb der Familie von den homologen Proteinen ähnliche Funktionen übernommen werden. Die hohe Homologie innerhalb der GLI-Familie zeigt sich in sieben Proteindomänen, die allen Familienmitgliedern gemein sind (Ruppert *et al.*, 1990). Drei dieser Domänen findet man ebenfalls in *ci* (Kalff-Suske *et al.*, 1999). Bei Studien über die embryonale Entwicklung von *Drosophila* wurde *ci* als Mitglied der hedgehog-Signalkaskade identifiziert (Alexandre *et al.*, 1996). Dieser Signalweg, der über die Expression des Morphogens hedgehog reguliert wird, findet sich auch bei Vertebraten wieder. Er definiert die Polarität der antero-posterioren Achse. *Ci* wird bei Wirbeltieren durch die GLI-Proteinfamilie repräsentiert. Allen gemeinsam ist die Wirkung als Transkriptionsfaktor, der das extrazelluläre Hedgehog-Signal in eine nukleäre Reaktion umsetzt. Aza-Blanc und Mitarbeitern gelang es 1997, den entscheidenden Regulationsmechanismus für die Wirkung von *cubitus interruptus* in Imaginalscheiben von *Drosophila* aufzudecken. Sie

konnten zeigen, daß der mRNA-Level in allen *ci*-exprimierenden Zellen des anterioren Bereiches gleich ist, aber daß die Proteinmenge stark variiert. Es konnten zwei Formen des TF-Proteins nachgewiesen werden, die sich subzellulär abweichend verteilen und durch posttranslationale Modifikation entstehen. Die Funktion von *ci* wird über eine proteolytische Spaltung reguliert, bei der ein aus N-Terminus und Zinkfingerdomäne bestehender Repressor (*ci*-75; *ci*^{Rep}) gebildet wird. Dieser Repressor zeigt eine überwiegende Lokalisation im Zellkern der exprimierenden Zellen, während das Gesamtprotein (*ci*-155) wohl zum größten Teil zytoplasmatisch vorliegt. Erst die Umwandlung von *ci*¹⁵⁵ in seine aktivierende Form (*ci*^{Akt}) führt vermutlich zu einem Lokalisationswechsel des aktivierten Gesamtproteins in den Kern, wo es auf die Zielsequenzen wirken kann. Allerdings ist weder der Aktivator noch seine Lokalisation bisher nachgewiesen worden. Untersuchungen darüber, wie diese strikte Verteilung gewährleistet wird und ob diese eine Bedeutung für die Wirkung des Proteins hat, brachten zusätzliche Erkenntnisse über den Regulationsmechanismus. *Cubitus interruptus* ist als gesamtes Protein Teil eines zytoplasmatischen Komplexes, der an Mikrotubuli assoziiert, die Retention des Transkriptionsfaktors bewirkt. Dabei spielen weitere Komponenten der hedgehog-Signalkaskade die entscheidende Rolle. *Ci* zeigt eine direkte Interaktion mit *costal 2* (*cos2*) und dem *suppressor of fused* (*su(fu)*). Während *su(fu)* an den Bereich zwischen Aminosäure 1 und 346 von *ci* bindet und damit einen Kernimport verhindert, gibt es für *cos2* eine speziell benannte Interaktionsdomäne, *CORD* (*cos2* responsive domain). Die 125 Aminosäuren lange, auf *cos2* reagierende Domäne befindet sich im C-terminalen Bereich von *ci* an Position 941 bis 1065. Sie stellt das zentrale Element der zytoplasmatischen Retention dar, denn *cos2* ist das einzige Protein mit einer direkten Interaktion zu den Mikrotubuli. Die Abwesenheit dieser beiden Domänen, oder aber eine durch Mutation eingefügte Sequenzänderung hat eine überwiegend nukleäre Lokalisation von *ci* zur Folge (Wang *et al.*, 2000a). Sein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal, das sich am C-terminalen Ende der DNA-bindenden Domäne befindet (Aminosäureposition 581 bis 616), reicht aus, den Lokalisationswechsel zu ermöglichen (Wang *et al.*, 1999). Gleichzeitig spielt diese Komplexbildung aber auch eine entscheidende Rolle für die Generierung der Repressorform. Die *cos2* und *su(fu)* vermittelte Assoziation von *cubitus interruptus* mit den Mikrotubuli macht es gleichzeitig zugänglich für eine Proteinkinase A (*Pka*)-vermittelte Phosphorylierung und diese ist ausschlaggebend für die Spaltung. Das modifizierte *ci* wird so zum Substrat für eine durch das *slimb*-Protein vermittelte proteolytische Spaltung durch ein Proteasom. Die den N-Terminus und die Zinkfingerdo-

mäne enthaltende, abgespaltene Repressorform löst sich auf Grund der fehlenden Interaktionsmöglichkeit mit *cos2* von den Mikrotubuli. Das in *ci*⁷⁵ noch beinhaltete Kernlokalisationssignal bewirkt den Lokalisationswechsel Richtung Kern, wo es akkumuliert. Diese Anreicherung ist begründet durch das Fehlen eines im Gesamtprotein unmittelbar nach der Spaltstelle gelegenen Kernexportsignals an Aminosäureposition 675 bis 860. Zu Beginn als zytoplasmatisches Lokalisationssignal definiert, konnte diesem Bereich durch weitere Studien die Funktion eines Kernexportsignals zugeordnet werden (Chen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000a). Zusammenfassend ist festzustellen, daß im C-terminalen Bereich von *ci* neben aktivierenden Domänen auch Bereiche vorhanden sind, die seine Lokalisation und damit indirekt auch seine Aktivität beeinflussen. Während das Gesamtprotein, überwiegend zytoplasmatisch nachweisbar, durch Komplexbildung mit Mikrotubuli assoziiert ist, zeigt die *ci*^{Rep} Form eine nukleäre Akkumulation. Diese interessanten Daten bezüglich *cubitus interruptus* werfen die Frage auf, ob für das humane Homolog GLI3 ein ähnliches Verteilungsmuster und indirekt damit auch eine ähnliche Regulation denkbar ist.

4.6.2 Die subzelluläre Verteilung von GLI3-GFP-Fusionsproteinen wird durch unterschiedliche GLI-Homologiedomänen beeinflusst

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten GLI3-GFP-Fusionskonstrukte, die entweder die Sequenz des kompletten *GLI3*-Gens enthalten, oder aber nur bestimmte GLI-Homologiedomänen, bewirken nach transienter Transfektion eine Expression von Fusionsproteinen. Deren subzelluläre Verteilung kann auf Grund der Fluoreszenzeigenschaft von GFP (Green Fluorescence Protein) detektiert werden. GFP wird mit einem Molekulargewicht von ungefähr 28 kDa als kleines Protein eingestuft. Trotzdem kann es nach der Fusion mit dem gesamten GLI3 bzw. mit einigen seiner Homologiedomänen deren Eigenschaften wie z.B. Verteilung beeinflussen. Um eine solche Einflußnahme nachweisen zu können, wurden alle zu testenden Konstrukte grundsätzlich als N- und C-terminale GFP-Fusionen hergestellt, das heißt, einmal befindet sich GFP am C-Terminus und im anderen Fall am N-Terminus von GLI3 (siehe Abbildung 24, Kapitel 3.4.1). Falls GFP auf Grund der räumlichen Nähe mit einer funktionellen Domäne von GLI3 interagiert, müßte sich das N-terminal markierte Protein vom C-terminal markierten in seiner Funktion unterscheiden. Alle in dieser Arbeit generierten N- und C-

terminalen Fusionskonstrukte, die eine identische GLI3-Sequenzinformation enthielten, zeigten eine vergleichbare subzelluläre Verteilung. GFP hat damit offensichtlich keinen Einfluß auf die GLI3-Verteilung. Weiterhin wurden für die Transfektionsexperimente unterschiedliche Wirts-Zelllinien verwendet, sowohl Zellen, bei denen endogen eine GLI3-mRNA nachweisbar war (U2-OS und COS-7; Topp, 1997), oder solchen ohne GLI3-mRNA (NCI-H157; Jacobsen, 1996). Der Vergleich der Transfektionsergebnisse deckte auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Proteine nach Überexpression auf (siehe Abbildung 25, Kapitel 3.4.2). Das Fusionsprotein, welches neben GFP nur den N-Terminus von GLI3 einschließlich der Homologiedomäne 1 enthielt, befindet sich überwiegend im Zytoplasma der Zellen. Diese Beobachtung bestätigt einen Befund von Shin und Mitarbeitern aus dem Jahr 1999. Die Lokalisation ist ein Hinweis darauf, daß sich ein putatives Kernlokalisierungssignal jenseits dieses Sequenzbereiches befinden muß. Diese Interpretation ist mit den experimentellen Daten über *ci* (Wang *et al.*, 1999) vereinbar. Die Beobachtung, daß ein gewisser Anteil von Zellen auch eine durch das Protein vermittelte Färbung des nukleären Kompartiments zeigt, läßt sich anhand des Molekulargewichts erklären. Mit 60 kDa liegt dieses Fusionsprotein im Grenzbereich der freien Diffusion durch die Kernporen. Proteine mit einem Gewicht höher als 60 kDa scheinen nicht mehr in der Lage zu sein, passiv in den Zellkern zu gelangen, sondern sie benötigen einen aktiven Transportmechanismus, definiert über die zeitabhängige Aufnahme eines bestimmten Proteins in den Zellkern (Alberts *et al.*, 1987). Das in den Zellen exprimierte Fusionsprotein hat mit 60 kDa also möglicherweise noch eingeschränkt die Möglichkeit, in den Zellkern zu gelangen, und bewirkt damit die Anfärbung.

GLI3-GFP-Fusionskonstrukte, die die GLI Homologiedomänen 1 und 2 enthalten, zeigen nach Proteinexpression eine Verteilung auf beide Zellkompartimente. Allerdings ist eine deutliche Zunahme der reinen Kernfärbung sowohl zahlenmäßig, als auch von der Intensität her festzustellen. Dieses Protein enthält auf Grund des klonierten Sequenzbereiches das putative Kernlokalisierungssignal, das sich am Ende der zweiten Homologiedomäne, der Zinkfingerdomäne, befindet (Wang *et al.*, 1999). Die Umverteilung der Proteine in Richtung Kern ist deutlich. Diese Umverteilung konnte auch schon von anderen Arbeitsgruppen unter Einsatz unterschiedlicher Zelllinien (Hek293- und HeLa-Zellen) und anderer Transfektionssysteme (Proteininjektion in Froschembryonen) gezeigt werden (Shin *et al.*, 1999; Ruiz i Altaba, 1999b). Wenn man sich die Beobachtungen von *cubitus interruptus* in Erinnerung ruft, so fällt auf, daß ein ganz ähnliches Pro-

teinfragment die Repressorform dieses Transkriptionsfaktors bildet. Die durch proteolytische Spaltung entstandene ci^{75} -Form endet ebenfalls kurz nach der DNA-bindenden Domäne und zeigt gleichfalls vorwiegend eine Kernlokalisation. Offensichtlich scheinen Gemeinsamkeiten im Verhalten der Proteine auch auf dieser Ebene zu existieren. Man muß allerdings berücksichtigen, daß die Repressorform von ci endogen durch die Zellen generiert wird, während es sich im Fall von GLI3 um ein nach transienter Expression überexprimiertes Fusionsprotein handelt (Aza-Blanc *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Methot *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000).

GLI3-GFP-Fusionskonstrukte, die die ersten drei GLI-Homologiedomänen enthalten, bewirken wie das zuvor beschriebene Konstrukt, eine Proteinverteilung auf beide Zellkompartimente, aber bei dem weitaus größten Anteil der beurteilten Zellen befindet sich das Fusionsprotein ausschließlich im Zellkern. Damit wird eine eindeutige Umverteilung in Richtung Zellkern deutlich (siehe Abbildung 25, Kapitel 3.4.2). Im Vergleich zum Konstrukt mit den zwei Homologiedomänen befindet sich hier offensichtlich keine zusätzliche Sequenzinformation, die die Proteinverteilung beeinflusst.

Betrachtet man die Verteilung der Fusionsprodukte, die entweder den Sequenzbereich bis einschließlich Domäne 6, oder aber das komplette GLI3 enthalten (siehe Abbildung 25, 26 e und f, 27 e und f), so ist eine erneute Umverteilung der Proteine festzustellen. Die Proteine beider Konstrukte zeigen eine mehr oder weniger gleichmäßige Verteilung über die Zelle. Sie befinden sich sowohl im Kern, aber verstärkt auch wieder im Zytoplasma. Während das Protein mit den Domänen 1 bis 6 noch häufiger eine isolierte Kernfärbung der Zellen zeigt, ist das klonierte GLI3-Gesamtprotein weitgehend zytoplasmatisch. Das bedeutet, es kommt zu einer zunehmend stärkeren Konzentrierung der Proteine im Zytoplasma, je größer die C-terminalen GLI3-Anteile werden. Diese Beobachtung bestätigt Befunde anderer Arbeitsgruppen (Shin *et al.*, 1999; Ruiz i Altaba, 1999). Allerdings zeigten Aza-Blanc und Mitarbeiter im Jahre 2000, daß humanes GLI3-Protein, welches in *Drosophila* Zellen exprimiert wird, eine primär nukleäre Anreicherung zeigt. Dieses abweichende Verhalten wurde dadurch erklärt, daß es sich bei dieser detektierten Form eventuell um ein GLI3-Spaltprodukt und nicht um das gesamte Protein handelt. Die für *cubitus interruptus* bekannte proteolytische Spaltung sollte demnach auch bei GLI3 stattfinden, wenn dieses sich im natürlichen Umfeld von ci befindet. Die unter diesen Umständen generierte Repressorform von GLI3 zeigt dann wie ci^{Rep} die beschriebene, konstitutiv nukleäre Lokalisation. Für das in dieser Arbeit verwendete experimentelle System ist allerdings eine Verteilung bevorzugt im Zytoplasma auszu-

machen, unabhängig von der GFP-Fusion (C- oder N-terminal). Vermutlich wird unter diesen Bedingungen die putative Repressorform von GLI3 nicht gebildet (vergleiche 4.7.1 und 4.7.2), da man sonst eine Kernlokalisierung der Fusionsproteine mit dem C-terminal von GFP liegenden GLI3 erwartet hätte. Eine mögliche Erklärung dafür, daß sich sowohl das gesamte GLI3-Protein, wie auch das mit den Domänen 1 bis 6 überwiegend im Zytoplasma befindet, ist im DNA-Abschnitt hinter der Homologiedomäne 3 bis hinter der Homologiedomäne 6 zu suchen. Er muß offensichtlich eine Information enthalten, die für die Anreicherung der Proteine im Zytoplasma verantwortlich ist. Bei dieser Information kann es sich um ein strukturelles Motiv bzw. eine Interaktionsdomäne handeln, die eine Assoziation zum Zytoskelett vermittelt, vergleichbar der CORD-Domäne von *cubitus interruptus*, die die Verbindung zwischen *ci* und *cos2* und damit zu den Mikrotubuli darstellt (Wang *et al.*, 2000a). Daneben könnte ein solcher DNA-Abschnitt auch für ein Kernexportsignal (NES) kodieren, das dem Kernlokalisations-signal (NLS) entgegenwirkt. Abhängig davon, welches der beiden Signale die entscheidende Wirkung vermittelt, könnte es zu einer Änderung in der Proteinlokalisierung kommen. Ein solches NES (Leucin-reiches Kernexportsignal) konnte in der Tat als hochkonserviertes Motiv innerhalb von GLI1 aus Mensch, Maus, Hühnchen und *Xenopus* detektiert werden. Darüber hinaus ist es auch sowohl bei *cubitus interruptus* als auch beim humanen GLI3 zu finden. Während bei *ci* drei Sequenzbereiche dieses hochkonservierte Motiv zeigen, sind innerhalb von GLI3 zwei Domänen auszumachen, die einem solchen NES entsprechen. Das erste Leucin der ersten Domäne liegt an Aminosäureposition 945. Sie umfaßt neun Aminosäuren, während sich das zweite NES aus elf Aminosäuren zusammensetzt und an Position 960 beginnt (Kogermann *et al.*, 1999). Beide Bereiche liegen innerhalb der 120 Aminosäuren, die die Homologiedomänen 5 und 6 verbinden und zwar ganz in der Nähe des C-terminalen Endes der Domäne 5. Die Lage dieser Sequenzmotive ist nicht nur mit den bereits erwähnten Resultaten bezüglich des gesamten GLI3-Proteins und der hinter Domäne 6 C-terminal deletierten Form in Einklang zu bringen. Auch die Lokalisation der beiden letzten getesteten Fusionskonstrukte sind mit der Anwesenheit eines solchen Signals an der angegebenen Position vereinbar (siehe Abbildung 26 und 27 e, f, g; Kapitel 3.4.2). Im ersten Fall handelt es sich um die Fusion der GLI3-Domänen 4 bis 6 an den N-Terminus von GFP. Dieses Fusionsprotein zeigt bei allen beurteilten Zellen eine gleichmäßige Verteilung auf Kern und Zytoplasma. Lediglich die NCI-H157 Zellen, die endogen keine GLI3-mRNA enthalten, zeigen eine isolierte Anreicherung des Proteins im Zytoplasma in über 50% der

Zellen. Die tendenzielle Verteilung in Richtung Zytoplasma ist hier deutlicher zu detektieren, ist aber auf Grund des Molekulargewichtes des Fusionsproteins, das eine freie Diffusion zuläßt, nicht unbedingt von funktioneller Bedeutung. Die überwiegende Detektion des Proteins im Zytoplasma bei den NCI-H157 Zellen könnte durch die Anwesenheit des NES in dieser Zelllinie auf Grund zusätzlicher oder fehlender Faktoren (GLI3-mRNA negative Zelllinie) stärker beeinflusst sein. Um diese Frage endgültig zu klären, sind weitere Analysen bezüglich der Bedeutung des möglichen Kernexportsignals nötig. Der an den C-Terminus von GFP fusionierte Anteil von GLI3, im letzten der getesteten Fusionskonstrukte, enthält das letzte Viertel der GLI Homologiedomäne 2 bis zum C-terminalen Ende des Transkriptionsfaktors. Dieses Fusionsprotein zeigt eine nahezu identische Verteilung innerhalb der Zelle, wie das unmittelbar zuvor beschriebene 50 kDa Protein. Allerdings ist dieses ein 160 kDa schweres Protein, bei dem die Diffusion keinerlei Bedeutung für seine Verteilung hat. Nachdem der klonierte GLI3-Sequenzbereich hier sowohl das Kernlokalisations- wie auch das Kernexportsignal umfaßt, können beide Domänen das Fusionsprotein beeinflussen. Was den Ausschlag für die Lokalisation im Kern oder im Zytoplasma gibt, ist unbekannt. Im Vergleich zu dem C-terminalen markierten Fusionskonstrukt, welches das gesamte GLI3 enthält, zeigt dieses im N-Terminus von GLI3 verkürzte Fusionsprotein eine deutlichere Tendenz Richtung Zytoplasma (siehe Abbildung 25 und Abbildung 27g, Kapitel 3.4.2). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß N-terminale Sequenzen, eventuell über die NLS oder das NES Einfluß auf die Verteilung des Proteins nehmen.

Neben der im Abschnitt zuvor diskutierten Verteilung der einzelnen Fusionsproteine innerhalb der Zellen, fielen immer wieder Strukturen mit außergewöhnlichem Färbeverhalten auf. Da diese Besonderheiten aber allenfalls bei 10% der Zellen beobachtet wurden, bleibt es fraglich, welche Bedeutung sie besitzen. Grundsätzlich geht man davon aus, daß die Darstellung funktionell bedeutsamer Strukturen durch die Assoziation mit den Fusionsproteinen in weitaus mehr als nur einem Zehntel aller Zellen detektiert werden sollte. Zellzyklus-abhängige Mechanismen allerdings, würden diese Voraussetzungen nur in synchronisierten Zellkulturen erreichen. Aus diesem Grund ist es denkbar, daß auch ein seltenes, ungewöhnliches Färbeverhalten eine funktionell bedeutsame Situation charakterisiert. In den Abbildungen 26 b-g und 27 b-g, Kapitel 3.4.2 sind jeweils exemplarisch die Proteinlokalisationen der einzelnen N- und C-terminalen GFP-Fusionsproteine dargestellt. Dabei wurde darauf geachtet, besonders das jeweils ungewöhnliche Verteilungsmuster, das nur maximal 10% der Zellen zeigten, zu dokumentie-

ren. So zeigen beispielsweise die an den C- oder N-Terminus von GFP fusionierten GLI3-Domänen 1 und 2 neben der primär nukleären Lokalisation auch filigrane, netzartige Strukturen im Zytoplasma, die stellenweise noch mit perlenartigen Strukturen besetzt scheinen. In diesem Fall könnte es sich um eine Assoziation mit einer Komponente des Zytoskeletts handeln, ähnlich wie bei *cubitus interruptus*, für das eine Tubulinassoziation in Form eines großen zytoplasmatischen Komplexes postuliert wird. Um die Richtigkeit dieser Vermutung zu verifizieren, wurde die mögliche Verbindung mit Tubulin getestet. Neben diesen netzartigen Strukturen, verteilt über die gesamte Zelle, konnten auch große zytoplasmatische Aggregate beobachtet werden. Diese zeigten sich bei allen Fusionsproteinen, die die GLI3-Domänen 4 bis 6 enthielten. Fehlte zusätzlich der Bereich 1-4, waren die Zytoplasmaaggregate um den Kern gruppiert. Bei dieser Proteinansammlung kann es sich entweder um einen durch Überexpression des Fusionsproteins induzierten Artefakt handeln, oder aber diese Aggregate markieren Orte funktionseller Bedeutung. Die Anreicherung des Proteins in gewissen Regionen kann beispielsweise anzeigen, daß dort modifizierende Prozesse ablaufen. Eine dafür prädestinierte Zellorganelle ist der Golgi-Apparat. Er besteht aus mehreren Feldern, gestapelter Membranhohlräume, die nicht miteinander verbunden sind und sich ganz in der Nähe des Zellkerns befinden. Eine der Hauptfunktionen des Golgi-Feldes ist es, Proteine zu kondensieren und umzubauen. Sie werden dort mit aktivierten Kohlehydraten verknüpft, wodurch Glykoproteine entstehen (Junqueira et al., 1991). Solche Umbauprozesse könnten durchaus mit einer Anreicherung der Proteine einhergehen, die dann in Form von Aggregaten sichtbar werden. Sollte es sich bei den Proteinaggregaten um eine durch Überexpression verursachte Struktur handeln, so sollten kürzere Expressionszeiten nach Transfektion zur Reduktion bzw. zur vollständigen Abwesenheit der Aggregate führen. Experimente, bei denen die Zellen nach Transfektion zu unterschiedlichen Zeiten fixiert wurden (Daten nicht gezeigt), brachten keine Abweichungen vom ursprünglichen Ergebnis. Selbst die schon nach 12 h fixierten Präparate zeigten prozentual die gleiche Anzahl von Zellen mit diesem Phänomen. Der Einsatz eines Expressionsvektors mit induzierbarem Promotor könnte bezüglich der Überexpressionsphänomene eine noch genauere Einschätzung liefern. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, daß eine ausreichende Menge an Fusionsprotein entstehen muß, damit die Fluoreszenz von GFP detektierbar wird. Neben den Aggregaten im Zytoplasma, konnten andere exklusiv im Zellkern detektiert werden. Dabei war es ohne Bedeutung, ob das Zytoplasma ebenfalls Fusionsproteine enthielt, oder ob sich diese nur im Zellkern befanden. Auch die Vertei-

lung der Proteinaggregate im Kern der Zelle schien nicht zufällig. Es könnte sich um einen Überexpressionsartefakt handeln, oder eine spezielle Funktion könnte zu einer Ansammlung der Proteine führen. Zellkerne sind aufgeteilt in Domänen und Territorien, in denen jeweils spezifische Funktionen erfüllt werden. Für die jeweiligen Aufgaben wird durch die Kompartimentalisierung ein optimales Reaktionsmilieu geschaffen (Hodges *et al.*, 1998). Durch diese Abgrenzungen kommt es zu einer zum Teil als Kondensation sichtbaren lokalen Anreicherung bestimmter Substanzen. Die „nuclear bodies“, auch als „speckles“ oder "PML bodies" bezeichnet, sind beispielsweise Domänen, in denen sich verschiedene, definierte Proteine anreichern. Möglicherweise ist GLI3 mit einer Komponente innerhalb dieser „nuclear bodies“ assoziiert. Als Interaktionspartner für GLI3 innerhalb der „nuclear bodies“ wären das CREB-bindende Protein (CBP) und SUMO-1 vorstellbar. Beide befinden sich in konzentrierter Form in diesen Domänen (Hodges *et al.*, 1998). Für den Koaktivator vieler Transkriptionsfaktoren CBP ist eine Interaktion mit GLI3 bei der Transaktivierung bereits beschrieben (Dai *et al.*, 1999). Die Aggregatbildung der Fusionsproteine im Kern hätte eine physiologische Grundlage, vorausgesetzt die CBP-Anreicherung in der nukleären Domäne der "PML bodies" (La Morte *et al.*, 1998; Doucas *et al.*, 1999) hätte gleichzeitig eine Bedeutung bei der Interaktion mit GLI3. Neben dieser bereits bekannten Interaktion wäre auch eine über SUMO-1 vorstellbar. Wie in Kapitel 4.5.4 bereits diskutiert, besitzt GLI3 in seinem N-Terminus sechs Konsensussequenzen für eine SUMO-1 (Sentrin-1) vermittelte Modifikation. Bei der Sumoylierung handelt es sich um eine Ubiquitin-ähnliche Reaktionskette zur Proteinumwandlung, deren Auswirkungen jedoch vollkommen unterschiedlich zur Ubiquitinylierung sind. Sie beeinflusst unter anderem die Transaktivierungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren, oder die Lokalisation von Proteinen und kann Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau verhindern (Yeh *et al.*, 2000). Der Wirkung von SUMO-1 auf GLI3 in Form einer die Transaktivierungsfähigkeit beeinflussenden Modifikation, wie sie für p53 gezeigt werden konnte (Rodriguez *et al.*, 1999), könnte ebenfalls die Lokalisation von GLI3 bestimmen, was für das PML-Protein Sumoylierungs-abhängig bereits publiziert wurde (Boddy *et al.*, 1996; Hodges *et al.*, 1998). Somit bietet sich eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Aggregation der GLI3-GFP-Fusionsproteine in bestimmten Regionen des Zellkerns an. Um zu testen, ob und welcher der Mechanismen tatsächlich die Lokalisation von GLI3 beeinflusst, wären weiterführende Experimente notwendig. Beispielsweise könnte die Kolokalisation von GLI3 und CBP jeweils über einen spezifischen Antikörper gegen die Proteine ermittelt wer-

den. Außerdem könnte der Einfluß der *in vitro* mutierten Sumoylierungsstellen auf die Lokalisation der Fusionsproteine getestet werden. Zu untersuchen wäre, ob eine generelle Kernlokalisierung der Proteine auch weiterhin möglich ist und ob sie zudem weiterhin zur Aggregatbildung tendieren.

Betrachtet man, abgesehen von den oben beschriebenen Auffälligkeiten, die Resultate der GLI3-GFP-Lokalisationsstudien im Vergleich zu den bei *cubitus interruptus* ermittelten Daten, so ergibt sich ein sehr deutlicher Unterschied. Bei *ci* ist eine eindeutige Zweiteilung im Lokalisationsverhalten der Proteinformen zu beobachten. Das Gesamtprotein ist ausschließlich im Zytoplasma zu detektieren, während die durch proteolytische Spaltung entstehende Repressorform exklusiv im Kern nachweisbar ist (Aza-Blanc *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Diese eindeutige Verteilung ist für GLI3 nicht festzustellen. Zwar befinden sich die Proteine, die den N-Terminus des Transkriptionsfaktors enthalten, überwiegend im Zellkern, aber das Gesamtprotein zeigt als GFP-Fusion eine eher homogene Verteilung über die gesamte Zelle. Es ist allenfalls eine leichte Tendenz zu intensiverer Färbung des Zytoplasmas auszumachen (Shin *et al.*, 1999; Ruiz i Altaba, 1999; diese Arbeit). Aus diesem Grund ist die Regulierung der GLI3 Proteinfunktion nicht über eine spezielles Lokalisationsverhalten zu erklären.

4.6.3 Fusionsproteine aus Gesamt-GLI3 und GFP und ihre Interaktion mit Strukturen des Zytoskeletts

Bei den im vorherigen Kapitel erörterten Lokalisationsstudien des GLI3-Proteins, konnte in einigen Zellen eine ungewöhnliche Verteilung der Fusionsproteine detektiert werden. Sie bedeckten die gesamte Zelle mit einer „haarnetzartigen“ Struktur. Da für das GLI3-Homolog *cubitus interruptus* eine Assoziation mit den Mikrotubuli des Zytoskeletts postuliert wurde, könnte eine ähnliche Interaktion eine mögliche Erklärung für die ungewöhnliche, netzartige Ablagerung der GLI3-Proteine in den Zellen darstellen. Daraus könnte sich ein Hinweis auf die Regulation der Funktion des GLI3-Proteins ableiten. Um dieser Frage nachzugehen, wurden eine Assoziation mit den Mikrotubuli und anderen Komponenten des Zytoskeletts, wie Mikrofilamenten (Aktinfilamente) und intermediären Filamenten (Vimentin, Zytokeratin) getestet. Nach der Expression der Fusionsproteine wurden die Zellstrukturen gegengefärbt, so daß eine Kolo-kalisation von beiden durch eine Mischung der Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren wäre. Um die Beurteilung der Ergebnisse zu erleichtern, wurde als Positivkontrolle das tubulinassoziierte

Protein MID-1, ein Mitglied der RING-Finger-Familie, in Form eines GFP-Fusionsproteins eingesetzt. Dieses Protein zeigt eine exklusive Interaktion mit den Mikrotubuli, aber weder eine mit Aktinfilamenten, noch mit Vimentin, einem Bestandteil der intermediären Filamente (Cainarca *et al.*, 1999; Schweiger *et al.*, 1999). Die Präparate, die die Darstellung der Fusionsproteine und der Mikrotubuli zeigten, wurden sowohl über ein Fluoreszenzmikroskop als auch über ein konfokales Mikroskop ausgewertet. Das Schnittbild der konfokalen Mikroskopie, welches die Ansicht der Zelle nur in einer Ebene erlaubt zeigte keine Assoziation der Fusionsproteine mit den Mikrotubuli, die in Form gleich gebildeter Strukturen zu sehen sein sollte. Auch das Summationsbild des Fluoreszenzmikroskop war nicht in der Lage, eine eindeutige Kolokalisation über Bildung einer Mischfarbe zu zeigen. Leichte Farbveränderungen ergeben sich hier aus der Tatsache, daß die Signale beider dargestellten Komponenten sich aus technischen Gründen überlagern (siehe Abbildung 28 a und b oben, Kapitel 3.4.3). Betrachtet man im Vergleich dazu die Verteilung des MID-1 Proteins, so ist hier eine Interaktion mit der Zytoskelettkomponente eindeutig auszumachen. MID-1 akkumuliert dabei in Zellbereichen, die sich ebenfalls durch eine deutliche Mikrotubuliansammlung auszeichnen (siehe Abbildung 28 a und b unten, Kapitel 3.4.3) und zeigt stellenweise eine tubulinähnliche Filamentstruktur. Die nicht zu detektierende Assoziation von GLI3 mit den Mikrotubuli ist damit nicht auf Grund methodischer Probleme zu erklären, denn die Positivkontrolle zeigt das zu erwartende Ergebnis. Neben der Aggregatbildung von GLI3 ist aber durchaus eine homogene Färbung im Zytoplasma der Zelle auszumachen, die in keiner Weise an tubulinähnliche Strukturen erinnert. Bei den Experimenten bezüglich der Assoziation zu den übrigen Komponenten des Zytoskeletts zeigten sich für GLI3 keine eindeutigen Überlagerungen. der jeweils zwei Proteinkomponenten zu detektieren. Das Summationsbild beider mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Interaktionspartner sollte durch die Überlagerung zu einer eindeutigen Mischfarbe führen. Diese ist für keinen der drei Fälle auszumachen (siehe Abbildung 29, Kapitel 3.4.3), abgesehen von leichten Farbveränderungen, die sich auf Grund der Übereinanderlagerung der Fluoreszenzfarbstoffe durch das vom Mikroskop dargestellte Auflichtsbild ergeben. Auf Grund dieser Datenlage scheint eine Assoziation von GLI3 zum Zytoskelett sehr unwahrscheinlich. In diesem Zusammenhang bleibt die Frage nach einer vergleichbaren Regulation der Proteinfunktion von cubitus interruptus und GLI3. Ci als Teil eines zytoplasmatischen Komplexes ist mit den Mikrotubuli assoziiert und diese Interaktion scheint offensichtlich eine Voraussetzung für die posttranslationale Modifi-

kation des Proteins zu sein. Für GLI3 konnte eine solche Assoziation mit den Mikrotubuli unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich die Überlegung, ob in diesem Fall überhaupt eine Komplexbildung stattfindet und ob es trotzdem zur Generierung einer GLI3-Repressorform kommt. Die mögliche posttranslationale Modifikation von GLI3 wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.7 Posttranslationale Modifikation des GLI3-Proteins

Die Wirkungsweise eines Proteins wird außer durch seine funktionellen Domänen durch Modifikationen nach der Translation beeinflusst. Das GLI3 Homolog in *Drosophila*, *cubitus interruptus*, zeigt eine solche posttranslationale Modifikation, die die Spaltung des Proteins in eine Repressorform ermöglicht. Um Spaltprodukte von GLI3 zeigen zu können, wurden spezifische Antikörper generiert. Sie sollten genutzt werden, um bei GLI3-mRNA positiven Zellen (NCI-H661 und die Osteosarcomazelllinie U2-OS) endogenes GLI3- oder Spaltprodukte nachzuweisen. Das dies nicht gelang läßt sich dies mit der zu geringen Sensitivität der generierten Antikörper, verbunden mit der extrem geringen, endogen vorhandenen Proteinmenge innerhalb der Zellen für einen Nachweis in der Western Blot-Analyse begründen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Resultate der Gelretardierungsexperimente (siehe Kapitel 3.2.1 und Abbildung 13). Hier war sowohl der Nachweis des endogenen GLI3-Proteins durch eine retardierte Bande zu führen, als auch die Identifizierung des Proteins mit Hilfe der spezifischen Antikörper möglich. Die Sensitivität dieser Methode beim Proteinnachweis liegt allerdings weit über der von Western Blot-Analysen, denn es können bereits DNA-bindende Proteine mit Mengen im Femtomolbereich nachgewiesen werden (Ausubel *et al.*, 1994).

Dai und Mitarbeitern gelang 1999 der Nachweis von endogenem GLI3-Protein in Extrakten, gewonnen aus 11,5 Tage alten Mausembryonen. Sowohl ein gegen den N-Terminus, als auch gegen den C-Terminus von GLI3 gerichtetes Antiserum war in der Lage, das Protein in voller Länge wie auch prozessierte Formen zu detektieren. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um kommerziell zu erwerbende Peptidantikörper, die entweder die Aminosäuren 2-20 oder 1577-1596 des GLI3-Proteins erkennen. Der Wert der Beobachtungen, zumindest die mit dem gegen das angeblich C-terminale Peptid gerichteten Antikörper festgestellten, ist auf Grund neuerer Ergebnisse äußerst fragwürdig. Die im Laufe der Mutationssuche im *GLI3*-Gen durchgeführten

intensiven Sequenzanalysen vor Ort brachten einen Fehler in der Sequenz der ursprünglich publizierten GLI3-cDNA zu Tage. Die Deletion eines Nukleotids an Position 4649 der cDNA (Ruppert *et al.*, 1990) führt zu einer Verschiebung des Leserasters der DNA-Sequenz. Daraus resultiert ein GLI3-Protein, dessen C-Terminus 32 andere Aminosäuren besitzt und der um 16 Aminosäuren verkürzt ist (GLI3, 1580 Aminosäuren; persönliche Mitteilung H.Engel). Diese Veränderungen im Wildtypprotein machen den Einsatz und die Resultate des angeblich für den C-Terminus spezifischen Peptidantikörpers mehr als fragwürdig. Der verwendete Antikörper ist nur noch in der Lage, die letzten 3 Aminosäuren des Proteins zu detektieren und diese unterscheiden sich auch noch von denen, die ursprünglich angegeben wurden. Aus diesem Grund handelt es sich bei den von Dai und Mitarbeitern 1999 dargestellten Proteinbanden, die durch den gegen den C-Terminus von GLI3 gerichteten Antikörper detektiert wurden, mit höchster Wahrscheinlichkeit um unspezifische Signale. Ein Jahr später konnte dann endogenes GLI3 sowohl in Extrakten gewonnen aus Gliedmaßenknospen des Hühnchens, als auch der Maus, nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2000b). Ein neu generierter, GLI3-spezifischer Antikörper war in der Lage, sowohl das Protein in seiner vollen Länge, als auch eine 83 kDa schwere prozessierte Form nachzuweisen. Beide Proteine waren durch die Zugabe des spezifischen Antigens zum Antikörper in ihrer Detektion zu hemmen, was die Spezifität der Nachweisreaktion zeigt. Das GLI3-Gesamtprotein scheint damit also nicht die einzige Proteinform zu sein, die in diesem Gewebe existent ist, denn das verkürzte Protein wird mit der gleichen Spezifität detektiert. Neben den zum Teil sehr schwachen spezifischen Banden wurde auch sehr viel unspezifischer Hintergrund sichtbar. Offensichtlich lag die Proteindetektion hier ebenfalls an der Nachweisgrenze, obwohl in dem verwendeten Gewebe die GLI-Expression besonders hoch liegt (Büscher *et al.*, 1998; Schweitzer *et al.*, 2000). Selbst die Menge an GLI3-Transkriptionsfaktor-protein *in vivo* scheint also für eine deutliche spezifische Reaktion zu gering zu sein (Wang *et al.*, 2000b).

4.7.1 Transfizierte GLI3-GFP-Fusionsproteine sind unverändert nachweisbar

Nachdem bei meinen Untersuchungen der Nachweis von endogenem GLI3-Protein in Zellextrakten aus positiven Zellen (siehe auch Kapitel 3.2.1) nicht möglich war, wurde

mit transient exprimiertem Protein gearbeitet. Die exprimierten GFP-GLI3-Fusionsproteine wurden über Western Blot analysiert.

Die bereits für die Lokalisationsstudien verwendeten Expressionskonstrukte, bei dem das GLI3-Protein an den C-Terminus von GFP fusioniert ist (GFP-GLI3-Fusionsproteine), wurden zur transienten Transfektion genutzt. Für alle transfizierten Konstrukte konnte eine Proteinexpression sowohl über einen GFP- als auch einen GLI3-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht entsprach dem nach den enthaltenen GLI3-Proteindomänen errechneten addiert mit den annähernd 30 kDa des Indikatorproteins GFP. Es war beim gleichzeitigen Nachweis mit beiden Antikörpern jeweils nur eine spezifische Proteinbande zu detektieren. Weder der GFP- noch die beiden GLI3-spezifischen Antiseren waren in der Lage, im Präparat des Fusionsproteins, welches das gesamte GLI3 enthielt, eine zusätzliche Proteinbande zu detektieren (siehe Abbildung 30, Kapitel 3.5.1). Solch eine zusätzliche Bande wäre ein Hinweis auf Spaltung und würde den Ergebnissen mit den endogenen GLI3-Proteinen entsprechen (Dai *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2000b). Nachdem aber alle exprimierten Proteine nur als einzelne Bande, ohne zusätzliche Spaltprodukte zu detektieren sind, läßt es sich vermuten, daß unter unseren Reaktionsbedingungen keine posttranslationalen Modifikationsprozesse ablaufen. Damit vereinbar sind Ergebnisse aus Transfektionsexperimenten mit anderen humanen Zellen (HeLa und Hek293), oder aber mit Affennieren-Zellen (COS7) unter Verwendung völlig unterschiedlicher Expressionskonstrukte. Auch dort wird das GLI3-Gesamtprotein nicht in kürzere Proteinformen gespalten (Dai *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000b).

Eine Injektion aller GLI-Proteine in Froschembryonen hat eine Spaltung aller Familienmitglieder in kleinere Formen zur Folge (Ruiz i Altaba, 1999b). Dies ist eine zumindest für GLI1 sehr ungewöhnliche Beobachtung, denn GLI1 gilt als einziges Mitglied dieser Familie, bei dem eine posttranslationale Modifikation sehr unwahrscheinlich zu sein scheint (Dai *et al.*, 1999; Aza-Blanc *et al.*, 2000). Die Expression der GLI-Proteinfamilie in einem speziell entwickelten *Drosophila* Zellsystem konnte eine proteolytische Spaltung sowohl für GLI2 als auch für GLI3 zeigen. GLI1 allerdings zeigt innerhalb dieses Systems keinerlei Anzeichen für die Entstehung einer verkürzten Proteinform. Das in *Drosophila* entwickelte Zellsystem kann zusätzlich noch genutzt werden, den Einfluß des Morphogens hedgehog zu prüfen. Für cubitus interruptus gilt dabei, daß die Anwesenheit von hedgehog das Verhältnis von Repressorform zum Gesamtprotein zu Gunsten des Gesamtproteins verschiebt. Ein ähnliche Beobachtung läßt

sich auch für GLI3 feststellen, während die Menge an GLI2-Spaltprodukt unverändert bleibt (Aza-Blanc *et al.*, 2000). Eine vergleichbare Verschiebung der Verhältnisse der Formen von GLI3 ist auch in Extrakten von Gliedmaßenknospen aus Maus und Hühnchen festzustellen (Wang *et al.*, 2000b). Je nach der Region, aus der die Zellen stammen, die zur Extraktpräparation verwendet werden, kann entweder die prozessierte Form oder das gesamte GLI3-Protein mengenmäßig deutlicher nachgewiesen werden. Bei Zellen aus dem anterioren Anteil der Gliedmaßenknospe, in dem keine Sonic Hedgehog-Expression nachweisbar ist, wird fast ausschließlich die verkürzte 83 kDa schwere Form detektiert, während in den Zellen der posterioren Regionen mit sehr starker Sonic Hedgehog-Expression nur zu einem sehr geringen Teil diese prozessierte Form vorhanden ist. Allerdings ist in der Sonic Hedgehog-positiven Region keine eindeutige Zunahme der gesamten GLI3-Proteinmenge nachzuweisen. Grundsätzlich gilt auch für diese Experimente der Vorbehalt, daß das Gesamtprotein nur sehr schwach zu detektieren war.

Auf Grund dieser widersprüchlichen Daten ist eine eindeutige Aussage bezüglich der proteolytischen Spaltung von GLI3 sehr schwierig. Die Ergebnisse mit endogenem Protein geben jedoch einen deutlichen Hinweis darauf, daß modifizierende Prozesse ablaufen. Im Zellkultursystem sollte ein ähnlicher Regulationsmechanismus vorhanden sein und auch nachweisbar sein, zumindest in den Zelllinien, die auch endogen GLI3 exprimieren. Aber selbst in diesen Zelllinien ist die proteolytische Spaltung eines exprimierten GLI3-Proteins nicht zu detektieren. Möglicherweise bedarf es bei den humanen Zelllinien zusätzlicher Komponenten, die den posttranslationalen Modifikationsprozeß für GLI3 in Gang bringen.

4.7.2 Phosphorylierung als kritischer Parameter bei den GLI3-Modifikationsprozessen?

Für das GLI3-Homolog *cubitus interruptus* konnte ein wesentlicher Einfluß der Proteinphosphorylierung auf seine Regulation gezeigt werden. Das Protein besitzt vier Konsensusbereiche für eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (Pka), von denen offensichtlich nur drei genutzt werden (Chen *et al.*, 1999b). Pka ist in der Lage, die Aktivität und die Proteolyse von *cubitus interruptus* direkt zu regulieren (Chen *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus könnte für die Funktion von GLI3 ebenfalls von Bedeutung sein, denn auch dieses Protein enthält sechs putative Erkennungssequenzen für die Pro-

teinkinase A (Kemp *et al.*, 1990, Kalff-Suske *et al.*, 1999). PKA scheint dabei als ein negativer Regulator der hedgehog- bzw. Sonic Hedgehog-Signalkette zu wirken, denn die aktivierende Wirkung sowohl von *ci*, als auch von der isolierten transaktivierenden Domäne von GLI3 wird durch ihren Einfluß gehemmt (Dai *et al.*, 1999). Nachdem die Spaltung von *ci* offensichtlich durch eine Pka-vermittelte Phosphorylierung ermöglicht wird, sollte dieser Regulationsmechanismus auch für GLI3 getestet werden. Dazu wurden Zellen mit einem Expressionskonstrukt transient transfiziert, welches neben dem GFP die gesamte cDNA von GLI3 enthält. Nach Proteinexpression wurden diese Zellen mit Forskolin (FSK) behandelt. Bei FSK handelt es sich um eine chemische Verbindung, die als Aktivator der Adenylatzyklase wirkt, wodurch der zelluläre Spiegel an cAMP erhöht wird. Diese erhöhte cAMP Konzentration wiederum hat eine aktivierende Wirkung auf alle Proteinkinasen, einschließlich PKA (Kreutzig, 1992). Die Inkubation der Zellen mit Forskolin bewirkt damit die konstitutive Aktivierung der Proteinkinase A, unabhängig vom zellulären Reaktionsmilieu. Auf diese Weise sollte die putative Phosphorylierung des exprimierten GLI3-Proteins gefördert werden und nachfolgend sollte untersucht werden, ob GLI3 unter diesen Bedingungen gespalten wird. Als Negativkontrolle wurden Zellen unter gleichen experimentellen Bedingungen mit Didesoxy-Forskolin (ddFSK), einem unwirksamen Didesoxy-Analogon zu Forskolin behandelt. Die Fusionsproteine in den Zellextrakten wurden sowohl mit dem GFP- als auch mit α -N-GLI3 spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die über Forskolin gesteigerte Phosphorylierung der Fusionsproteine ist durch eine zusätzliche Proteinbande mit erhöhtem Molekulargewicht auszumachen. Diese Form ist in den als Negativkontrolle mitgeführten Ansätzen nicht zu detektieren. Ein zusätzliches GLI3-Spaltprodukt war jedoch auch unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar (siehe Abbildung 31, Kapitel 3.5.2). Die vermutete, über PKA-induzierte posttranslationale Modifikation des Transkriptionsfaktors GLI3 ist mit diesem Ansatz nicht zu bestätigen. Dem gegenüber zeigten ähnliche Experimente mit exprimierten GLI3-Proteinen in primären Zellen der Gliedmaßenknospe beim Hühnchen nach Forskolinbehandlung sowohl die Phosphorylierung des gesamten GLI3-Proteins, als auch seine Spaltung in eine verkürzte, 83 kDa schwere Form (Wang *et al.*, 2000b). Dies ist mit den Befunden zu vereinbaren, daß sich Zellen aus embryonalen Geweben anders verhalten, als etablierte Zelllinien (Dai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000b). Erstaunlich ist allerdings der Befund, daß auch COS1-Zellen nach Forskolinbehandlung GLI3 spalten (Wang *et al.*, 2000b). Wie entscheidend die Wahl der eingesetzten Zelllinie sein kann zeigt ein Experiment mit den Mauszellen

C3H10T1/2. Hierbei handelt es sich um Zellen, die durch Induktion mit Sonic Hedgehog-Zielgene exprimieren können, was über die einsetzende Ausdifferenzierung deutlich wird. Außerdem exprimieren sie alle drei GLI-Proteine. In diesem Fall sollte man davon ausgehen können, daß alle für eine Modifikation von GLI3 nötigen Faktoren in dieser Zelle enthalten sind. Nach transienter Transfektion und Expression von GLI3 in dieser Zelllinie konnte aber ebenfalls nur das Gesamtprotein detektiert werden. Erst die Koexpression mit einer konstitutiv aktiven Untereinheit der Proteinkinase A führte zum Nachweis von GLI3-Spaltprodukten (Ruiz i Altaba, 1999). Diese Resultate verdeutlichen, daß die Auswahl der experimentellen Bedingungen zum Nachweis von GLI3-Spaltprodukten entscheidend ist.

Im Tier scheint PKA an der Regulation des GLI3-Proteins beteiligt zu sein und eine Spaltung von GLI3 zu fördern. Damit besteht auch hierin eine funktionelle Gemeinsamkeit von GLI3 und seinem *Drosophila* Homolog cubitus interruptus.

4.8 Ausblick

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden tragen zur Analyse der Funktion des GLI3-Proteins bei. Mit ihnen ist zu untersuchen, welche Eigenschaften des Proteins durch Mutation in GLI3-Morphopathien gestört sind. Bezüglich der DNA-Bindung war es möglich, über die Gelretardierungsexperimente den zuverlässigen Nachweis einer Protein-DNA-Interaktion zu zeigen. Dieses System kann auch zukünftig genutzt werden, um die funktionelle Bedeutung von Missense-Mutationen in der Zinkfinger-Domäne zu prüfen. Die transkriptionelle Wirkung des GLI3-Proteins wird offensichtlich nicht nur durch die im C-Terminus detektierten, isolierten transaktivierenden Domänen 1 und 2 bestimmt. N-terminale Sequenzbereiche beeinflussen sie ebenso. Diesen regulierenden Sequenzbereich exakt einzugrenzen, und mögliche Proteindomänen festzulegen, kann helfen, zusätzliche Interaktionspartner für GLI-Proteine leichter ausfindig zu machen. In diesem Zusammenhang stellt die Modifikation über das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO-1 (Sentrin-1) einen interessanten Reaktionsweg dar. Auf Grund der vielfältigen Auswirkungen einer solchen Modifikation könnte sowohl die Aktivität von GLI3, dessen subzelluläre Lokalisation oder auch die Proteinstabilität beeinflusst werden. Alle diese Einflüsse wären durch die in dieser Arbeit etablierten funktionellen Analysen überprüfbar. Daraus könnten Schlußfolgerungen sowohl über die Funktion des GLI3-Proteins, wie auch über Zusammenhänge und Wechselwirkungen zwischen den ver-

schiedenen Proteinen der Hedgehog-Kaskade gezogen werden. In diesem Zusammenhang könnten weitere Gene dieser Signalkaskade identifiziert werden, deren Mutation zu phänotypischen Veränderungen führen, die den *GLI3*-Morphopathien ähneln. Zuvor eine Erklärung dafür zu finden, warum scheinbar ähnliche Mutationen des *GLI3*-Gens in einem Fall zum Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom, in einem anderen Fall zum Pallister-Hall Syndrom oder zu einer isolierten Polydaktylie wie PAP-A bzw. PAP-B und PPD-IV führt, bleibt eine spannende Aufgabe.

5. Zusammenfassung

GLI3 ist eines von drei Mitgliedern der *GLI*-Transkriptionsfaktorfamilie. Deletionen und Translokationen bei Patienten mit Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom (GCPS) deuteten auf das *GLI3*-Gen als Kandidatengen für die GCPS-Fehlbildungen. Die vollständige Identifizierung des *GLI3*-kodierenden Bereiches machte es möglich, mittels der Einzelstrang-Konformationsanalyse und nachfolgender Sequenzierung auch Punktmutationen im Gen zu detektieren. Missense-Mutationen wie Veränderungen, die zum Translationsstop führen, wurden über das Gen hin beobachtet. Außer beim GCPS wurden *GLI3*-Punktmutationen bei Patienten mit anderen Fehlbildungen detektiert, wie beim Pallister-Hall Syndrom (PHS), der Postaxialen Polydaktylie Typ A und Typ B (PAP-A/B) und der Präaxialen Polydaktylie Typ IV (PPD-IV). Diese Entwicklungsstörungen werden als *GLI3*-Morphopathien zusammengefaßt.

Mutationen im *GLI3*-Gen, die zu diesen Entwicklungsstörungen führen, können auf funktionell bedeutsame Bereiche des Proteins hinweisen. Ausgehend von einer umfangreichen Liste von Mutationen, die das gesamte *GLI3*-Gen überspannen, wurden in dieser Arbeit Mutanten auf Funktionsänderungen untersucht. Hierfür wurden zunächst Nachweisverfahren für funktionelle Aufgaben des Proteins wie DNA-Bindung, Aktivierung und Repression der Transkription oder Lokalisation in Kompartimenten der Zelle etabliert. *GLI3* mit 5 Zinkfinger vom C2-H2-Typ besitzt Homologe sowohl bei anderen Vertebraten als auch bei Invertebraten. *Cubitus interruptus (ci)* als *GLI*-Homolog in *Drosophila* ist der DNA-bindende Faktor der hedgehog-Signalkaskade, die als konservierte Signalkette in der Musterbildung bei den Vertebraten einschließlich des Menschen nachgewiesen werden kann. Auf Grund des hohen Konservierungsgrades gilt *ci* als Modell für die Analyse der Proteinfunktionen von *GLI3*, die in dieser Arbeit in Bezug auf Befunde bei *Drosophila* verfolgt wurden.

In einem Gelretardierungsverfahren wurde die DNA-Bindung von *GLI3*-Protein in Zellextrakten nachgewiesen. Die Identität des bindenden Proteins konnte über eine zusätzliche Inkubation mit eigens generierten *GLI3* spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieses Gelretardierungsassays wurde das Bindungsverhalten von bakteriell exprimiertem Zinkfingerpeptid als Wildtyp oder in mutierter Form getestet. Zwei in das Peptid eingebrachte Sequenzveränderungen, die zuvor im GCPS Patientenkollektiv als Missense-Mutationen detektiert worden waren, zerstörten die DNA-Bindungsfähigkeit der Zinkfingerregion vollständig. Die verantwortlichen Sequenzver-

änderungen lagen in hochkonservierten Bereichen, die an der Ausbildung der Zinkfingerstruktur beteiligt sind. Zwei an anderen Stellen in das Zinkfingerpeptid eingefügte Missense-Mutationen hatten dagegen keine Auswirkungen auf dessen DNA-Bindungsfähigkeit.

Die transaktivierende Wirkung von Wildtyp-GLI3 und von Mutanten wurde ebenfalls, auf Grund der bekannten Transaktivierungsfähigkeiten zweier unabhängiger C-terminaler GLI3-Domänen in GAL4-Fusionsproteinen, analysiert. Mit Reportergenkonstrukten, die artifizielle oder natürlich vorkommende GLI-Bindungsstellen enthielten, konnte keine für das GLI3-Gesamtprotein aktivierende Wirkung detektiert werden, gleichgültig, ob es als Wildtypprotein oder in mutierter Form vorlag. Ein durch Koexpression mit GLI1 etablierter Kompetitionsassay zeigte eine reprimierende Wirkung von GLI3 auf eine GLI1-vermittelte Aktivierung, die bei Deletion des N-Terminus von GLI3 nicht mehr festzustellen war. Dies war ein Hinweis darauf, daß dieser Sequenzabschnitt von GLI3 im Zusammenspiel mit anderen GLI-Proteinen eine transkriptionshemmende Funktionen besitzt, die möglicherweise durch Modulationen von GLI3 durch Sentrinization, vermittelt werden können.

Studien zur subzellulären Lokalisation des Transkriptionsfaktors GLI3 zeigten, daß N-terminale Sequenzen proximal einer putativen NLS-Region bevorzugt die Kernlokalisierung vermitteln, während durch den C-Terminus distal von diesem Bereich eher die Lokalisation im Zytoplasma gefördert wird. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen der Lokalisation des gesamten GLI3-Proteins und seiner C-terminalen Deletionskonstrukte war nicht möglich. Während alle Proteine mit Deletion des N-Terminus eine nukleäre Lokalisation zeigten, war das Gesamtprotein sowohl im Kern als auch im Zytoplasma zu detektieren. Das spricht dafür, daß Sequenzen in der C-terminalen Hälfte, zum Beispiel ein putatives Kernexportsignal, dem Transport in den Zellkern entgegenwirken.

Zum Nachweis einer möglichen posttranslationalen Modifikation, wie sie für cubitus interruptus bekannt ist, wurden exprimierte GLI3-Proteine mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die für ci gezeigte Spaltung in eine verkürzte Repressorform konnte in etablierten Zellkulturen und Fibroblastenzelllinien für GLI3 nicht nachgewiesen werden. Selbst die Phosphorylierung durch eine konstitutive Aktivierung der Proteinkinase A führte zu keinem Spaltprodukt, so daß die Modifikation der möglichen Prozessierung des GLI3-Proteins durch Mutationen nicht zu analysieren war.

Die in dieser Arbeit etablierten Analyseverfahren liefern eine aussagekräftige Grundlage, um die Auswirkungen weiterer Mutationen von GLI3-assoziierten Krankheitsbildern

auf die GLI3-Proteinfunktion zu testen und damit zum weiteren Verständnis der komplexen Steuerung der Entwicklung durch dieses Protein beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Akimaru, H., Y. Chen, P. Dai, D. X. Hou, M. Nonaka, S. M. Smolik, S. Armstrong, R. H. Goodman und S. Ishii** (1997). Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature* **386**: 735-8.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J.D. Watson** (1987). "Molekularbiologie der Zelle". VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Alcedo, J., Y. Zou und M. Noll** (2000). Posttranscriptional regulation of smoothened is part of a self-correcting mechanism in the Hedgehog signaling system. *Mol Cell* **6**: 457-65.
- Alexandre, C., A. Jacinto und P. W. Ingham** (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**: 2003-13.
- Altabef, M., J. D. Clarke und C. Tickle** (1997). Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* **124**: 4547-56.
- Andrews, N. C. und D. V. Faller** (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**: 2499.
- Antonarakis, S. E.** (1998). Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* **11**: 1-3.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmann, J.A. Smith und K. Struhl** (1994). "Current Protocols in Molecular Biology". Greene Publishing and Wiley-Intersciences, New York.
- Aza-Blanc, P. und T. B. Kornberg** (1999). Ci: a complex transducer of the hedgehog signal. *Trends Genet* **15**: 458-62.
- Aza-Blanc, P., H. Y. Lin, A. Ruiz i Altaba und T. B. Kornberg** (2000). Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development* **127**: 4293-301.
- Aza-Blanc, P., F. A. Ramirez-Weber, M. P. Laget, C. Schwartz und T. B. Kornberg** (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* **89**: 1043-53.
- Biesecker, L. G.** (1997). Strike three for GLI3. *Nat Genet* **17**: 259-60.
- Bitgood, M. J. und A. P. McMahon** (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* **172**: 126-38.
- Boddy, M. N., K. Howe, L. D. Etkin, E. Solomon und P. S. Freemont** (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* **13**: 971-82.

- Borycki, A.-G., L. Mendham und C.P.Jr.Emerson** (1997). Chicken GLI2/GLI4 partial mRNA sequences. Unpubliziert. GENBANK-Suche.
- Borycki, A. G., L. Mendham und C. P. Emerson, Jr.** (1998). Control of somite patterning by Sonic hedgehog and its downstream signal response genes. *Development* **125**: 777-90.
- Boulikas, T.** (1994). Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. *J Cell Biochem* **55**: 32-58.
- Brewster, R., J. L. Mullor und A. Ruiz i Altaba** (2000). Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development* **127**: 4395-405.
- Buscher, D. und U. Ruther** (1998). Expression profile of Gli family members and Shh in normal and mutant mouse limb development. *Dev Dyn* **211**: 88-96.
- Cainarca, S., S. Messali, A. Ballabio und G. Meroni** (1999). Functional characterization of the Opitz syndrome gene product (midin): evidence for homodimerization and association with microtubules throughout the cell cycle. *Hum Mol Genet* **8**: 1387-96.
- Carpenter, D., D. M. Stone, J. Brush, A. Ryan, M. Armanini, G. Frantz, A. Rosenthal und F. J. de Sauvage** (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13630-4.
- Catala, M.** (2000). [Control of the positioning of the vertebrate limb axes during development]. *Morphologie* **84**: 17-23.
- Chen, C. H., D. P. von Kessler, W. Park, B. Wang, Y. Ma und P. A. Beachy** (1999). Nuclear trafficking of Cubitus interruptus in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression. *Cell* **98**: 305-16.
- Chen, Y., J. R. Cardinaux, R. H. Goodman und S. M. Smolik** (1999b). Mutants of cubitus interruptus that are independent of PKA regulation are independent of hedgehog signaling. *Development* **126**: 3607-16.
- Chen, Y., N. Gallaher, R. H. Goodman und S. M. Smolik** (1998). Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2349-54.
- Chen, Y. und G. Struhl** (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**: 553-63.
- Chuang, P. T. und T. B. Kornberg** (2000). On the range of hedgehog signaling. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 515-22.
- Cohn, M. J. und C. Tickle** (1996). Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends Genet* **12**: 253-7.
- Dai, P., H. Akimaru, Y. Tanaka, T. Maekawa, M. Nakafuku und S. Ishii** (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem* **274**: 8143-52.
- Denef, N., D. Neubuser, L. Perez und S. M. Cohen** (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* **102**: 521-31.

- Dennig, J., M. Beato und G. Suske** (1996). An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains.
Embo J **15**: 5659-67.
- Doucas, V., M. Tini, D. A. Egan und R. M. Evans** (1999). Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling.
Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 2627-32.
- Entchev, E. V., A. Schwabedissen und M. Gonzalez-Gaitan** (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp.
Cell **103**: 981-91.
- Feldman, R. M., C. C. Correll, K. B. Kaplan und R. J. Deshaies** (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p.
Cell **91**: 221-30.
- Forbes, A. J., A. C. Spradling, P. W. Ingham und H. Lin** (1996). The role of segment polarity genes during early oogenesis in *Drosophila*.
Development **122**: 3283-94.
- Fried, M. und D. M. Crothers** (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis.
Nucleic Acids Res **9**: 6505-25.
- Garner, M. M. und A. Revzin** (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system.
Nucleic Acids Res **9**: 3047-60.
- Giles, R. H., D. J. Peters und M. H. Breuning** (1998). Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease.
Trends Genet **14**: 178-83.
- Greig, D. M.** (1926). Oxycephaly.
Edinburgh Med.J. **33**: 189-218.
- Hagen, G., J. Dennig, A. Preiss, M. Beato und G. Suske** (1995). Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3.
J Biol Chem **270**: 24989-94.
- Hagen, G., S. Muller, M. Beato und G. Suske** (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes.
Nucleic Acids Res **20**: 5519-25.
- Hagen, G., S. Muller, M. Beato und G. Suske** (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3.
Embo J **13**: 3843-51.
- Hahn, H., C. Wicking, P. G. Zaphiropoulos, M. R. Gailani, S. Shanley, A. Chidambaram, I. Vorechovsky, E. Holmberg, A. B. Unden, S. Gillies, K. Negus, I. Smyth, C. Pressman, D. J. Leffell, B. Gerrard, A. M. Goldstein, M. Dean, R. Toftgard, G. Chenevix-Trench, B. Wainwright und A. E. Bale** (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome.
Cell **85**: 841-51.
- Hall, J. G., P. D. Pallister, S. K. Clarren, J. B. Beckwith, F. W. Wiglesworth, F. C. Fraser, S. Cho, P. J. Benke und S. D. Reed** (1980). Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus and postaxial polydactyly--a new syndrome? Part I: clinical, causal, and pathogenetic considerations.
Am J Med Genet **7**: 47-74.

- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J Mol Biol **166**: 557-80.
- Hart, H.** (1989).
Organische Chemie - Ein kurzes Lehrbuch.
VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Hodges, M., C. Tissot, K. Howe, D. Grimwade und P. S. Freemont** (1998). Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies.
Am J Hum Genet **63**: 297-304.
- Hughes, D. C., J. Allen, G. Morley, K. Sutherland, W. Ahmed, J. Prosser, L. Lettice, G. Allan, M. G. Mattei, M. Farrall und R. E. Hill** (1997). Cloning and sequencing of the mouse *Gli2* gene: localization to the Dominant hemimelia critical region.
Genomics **39**: 205-15.
- Hui, C. C. und A. L. Joyner** (1993). A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene.
Nat Genet **3**: 241-6.
- Hui, C. C., D. Slusarski, K. A. Platt, R. Holmgren und A. L. Joyner** (1994). Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development.
Dev Biol **162**: 402-13.
- Incardona, J. P., J. H. Lee, C. P. Robertson, K. Enga, R. P. Kapur und H. Roelink** (2000). Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1.
Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 12044-9.
- Ingham, P. W.** (1998a). Transducing Hedgehog: the story so far.
Embo J **17**: 3505-11.
- Ingham, P. W.** (1998b). Boning up on Hedgehog's movements.
Nature **394**: 16-7.
- Innis, J. W. und D. P. Mortlock** (1998). Limb development: molecular dysmorphology is at hand!
Clin Genet **53**: 337-48.
- Jacobsen, E.** (1996).
Charakterisierung einer Kontrollregion des Kandidatengens für das Greig-Syndrom.
Diplomarbeit im Studiengang Humanbiologie der Philipps-Universität Marburg.
- Jiang, J. und G. Struhl** (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb.
Nature **391**: 493-6.
- Johnson, D. R.** (1967). Extra-toes: anew mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse.
J Embryol Exp Morphol **17**: 543-81.
- Johnson, R. L. und C. J. Tabin** (1997). Molecular models for vertebrate limb development.
Cell **90**: 979-90.
- Junqueira, L. C. u. J. C.** (1991).
Histologie.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Kadonaga, J. T., K. R. Carner, F. R. Masiarz und R. Tjian** (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain.
Cell **51**: 1079-90.
- Kalderon, D.** (1997). Hedgehog signalling: Ci complex cuts and clasps.
Curr Biol **7**: R759-62.

Kalderon, D. (2000). Transducing the hedgehog signal.
Cell **103**: 371-4.

Kalff-Suske, M., A. Wild, J. Topp, M. Wessling, E. M. Jacobsen, D. Bornholdt, H. Engel, H. Heuer, C. M. Aalfs, M. G. Ausems, R. Barone, A. Herzog, P. Heutink, T. Homfray, G. Gillissen-Kaesbach, R. Konig, J. Kunze, P. Meinecke, D. Muller, R. Rizzo, S. Strenge, A. Superti-Furga und K. H. Grzeschik (1999). Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome.
Hum Mol Genet **8**: 1769-77.

Kang, S., J. M. Graham, Jr., A. H. Olney und L. G. Biesecker (1997). GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome.
Nat Genet **15**: 266-8.

Karpen, H. E., J. T. Bukowski, T. Hughes, J. P. Gratton, W. C. Sessa und M. R. Gailani (2001). The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane.
J Biol Chem **276**: 19503-11.

Kelley, R. I. (2000). Inborn errors of cholesterol biosynthesis.
Adv Pediatr **47**: 1-53.

Kelley, R. L., E. Roessler, R. C. Hennekam, G. L. Feldman, K. Kosaki, M. C. Jones, J. C. Palumbos und M. Muenke (1996). Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic Hedgehog?
Am J Med Genet **66**: 478-84.

Kemp, B. E. und R. B. Pearson (1990). Protein kinase recognition sequence motifs.
Trends Biochem Sci **15**: 342-6.

Kinzler, K. W., J. M. Ruppert, S. H. Bigner und B. Vogelstein (1988). The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins.
Nature **332**: 371-4.

Kinzler, K. W. und B. Vogelstein (1990). The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome.
Mol Cell Biol **10**: 634-42.

Klevit, R. E., J. R. Herriott und S. J. Horvath (1990). Solution structure of a zinc finger domain of yeast ADR1.
Proteins **7**: 215-26.

Kogerman, P., T. Grimm, L. Kogerman, D. Krause, A. B. Uden, B. Sandstedt, R. Toftgard und P. G. Zaphiropoulos (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1.
Nat Cell Biol **1**: 312-9.

Kreutzig, T. (1992).
"Kurzlehrbuch und Antwortkatalog Biochemie".
Jungjohann Verlagsgesellschaft mbH, Neckarsulm-Stuttgart.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**: 680-5.

Lam, C. W., J. Xie, K. F. To, H. K. Ng, K. C. Lee, N. W. Yuen, P. L. Lim, L. Y. Chan, S. F. Tong und F. McCormick (1999). A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas.
Oncogene **18**: 833-6.

LaMorte, V. J., J. A. Dyck, R. L. Ochs und R. M. Evans (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body.
Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 4991-6.

- Lee, J., K. A. Platt, P. Censullo und A. Ruiz i Altaba** (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* **124**: 2537-52.
- Lewis, P. M., M. P. Dunn, J. A. McMahon, M. Logan, J. F. Martin, B. St-Jacques und A. P. McMahon** (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* **105**: 599-612.
- Liu, C. Z., J. T. Yang, J. W. Yoon, E. Villavicencio, K. Pfendler, D. Walterhouse und P. Iannaccone** (1998). Characterization of the promoter region and genomic organization of GLI, a member of the Sonic hedgehog-Patched signaling pathway. *Gene* **209**: 1-11.
- Manouvrier-Hanu, S., M. Holder-Espinasse und S. Lyonnet** (1999). Genetics of limb anomalies in humans. *Trends Genet* **15**: 409-17.
- Marigo, V., R. A. Davey, Y. Zuo, J. M. Cunningham und C. J. Tabin** (1996b). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* **384**: 176-9.
- Marigo, V., R. L. Johnson, A. Vortkamp und C. J. Tabin** (1996a). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol* **180**: 273-83.
- Marine, J. C., E. J. Bellefroid, H. Pendeville, J. A. Martial und T. Pieler** (1997). A role for Xenopus Gli-type zinc finger proteins in the early embryonic patterning of mesoderm and neuroectoderm. *Mech Dev* **63**: 211-25.
- McMahon, A. P.** (2000). More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* **100**: 185-8.
- Melnick, A. und J. D. Licht** (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **93**: 3167-215.
- Methot, N. und K. Basler** (1999). Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus. *Cell* **96**: 819-31.
- Methot, N. und K. Basler** (2001). An absolute requirement for Cubitus interruptus in Hedgehog signaling. *Development* **128**: 733-42.
- Michaud, J. L., F. Lapointe und N. M. Le Douarin** (1997). The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure. *Development* **124**: 1453-63.
- Mo, R., A. M. Freer, D. L. Zinyk, M. A. Crackower, J. Michaud, H. H. Heng, K. W. Chik, X. M. Shi, L. C. Tsui, S. H. Cheng, A. L. Joyner und C. Hui** (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* **124**: 113-23.
- Moline, M. M., C. Southern und A. Bejsovec** (1999). Directionality of wingless protein transport influences epidermal patterning in the Drosophila embryo. *Development* **126**: 4375-84.
- Monnier, V., F. Dussillol, G. Alves, C. Lamour-Isnard und A. Plessis** (1998). Suppressor of fused links fused and Cubitus interruptus on the hedgehog signalling pathway. *Curr Biol* **8**: 583-6.

- Morata, G. und K. Basler** (1999). Cells in search of a signal.
Nat Cell Biol **1**: E60-1.
- Motoyama, J., J. Liu, R. Mo, Q. Ding, M. Post und C. C. Hui** (1998). Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus.
Nat Genet **20**: 54-7.
- Nagai, K., M. F. Perutz und C. Poyart** (1985). Oxygen binding properties of human mutant hemoglobins synthesized in *Escherichia coli*.
Proc Natl Acad Sci U S A **82**: 7252-5.
- Nanni, L., J. E. Ming, M. Bocian, K. Steinhaus, D. W. Bianchi, C. Die-Smulders, A. Giannotti, K. Imaizumi, K. L. Jones, M. D. Campo, R. A. Martin, P. Meinecke, M. E. Pierpont, N. H. Robin, I. D. Young, E. Roessler und M. Muenke** (1999). The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly.
Hum Mol Genet **8**: 2479-88.
- Ohlmeyer, J. T. und D. Kalderon** (1998). Hedgehog stimulates maturation of *Cubitus interruptus* into a labile transcriptional activator.
Nature **396**: 749-53.
- Orenic, T. V., D. C. Slusarski, K. L. Kroll und R. A. Holmgren** (1990). Cloning and characterization of the segment polarity gene *cubitus interruptus* Dominant of *Drosophila*.
Genes Dev **4**: 1053-67.
- Park, H. L., C. Bai, K. A. Platt, M. P. Matise, A. Beeghly, C. C. Hui, M. Nakashima und A. L. Joyner** (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation.
Development **127**: 1593-605.
- Parraga, G., S. J. Horvath, A. Eisen, W. E. Taylor, L. Hood, E. T. Young und R. E. Klevit** (1988). Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR1.
Science **241**: 1489-92.
- Parton, R. G. und K. Simons** (1995). Digging into caveolae.
Science **269**: 1398-9.
- Pavletich, N. P. und C. O. Pabo** (1993). Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers.
Science **261**: 1701-7.
- Pearse, R. V., 2nd, L. S. Collier, M. P. Scott und C. J. Tabin** (1999). Vertebrate homologs of *Drosophila* suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators.
Dev Biol **212**: 323-36.
- Perrimon, N.** (1995). Hedgehog and beyond.
Cell **80**: 517-20.
- Petrij, F., R. H. Giles, H. G. Dauwerse, J. J. Saris, R. C. Hennekam, M. Masuno, N. Tommerup, G. J. van Ommen, R. H. Goodman, D. J. Peters und et al.** (1995). Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP.
Nature **376**: 348-51.
- Platt, K. A., J. Michaud und A. L. Joyner** (1997). Expression of the mouse Gli and Ptc genes is adjacent to embryonic sources of hedgehog signals suggesting a conservation of pathways between flies and mice.
Mech Dev **62**: 121-35.
- Pohl, T. M., M. G. Mattei und U. Ruther** (1990). Evidence for allelism of the recessive insertional mutation *add* and the dominant mouse mutation *extra-toes* (*Xt*).
Development **110**: 1153-7.

- Radhakrishna, U., D. Bornholdt, H. S. Scott, U. C. Patel, C. Rossier, H. Engel, A. Bottani, D. Chandal, J. L. Blouin, J. V. Solanki, K. H. Grzeschik und S. E. Antonarakis** (1999). The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations.
Am J Hum Genet **65**: 645-55.
- Radhakrishna, U., A. Wild, K. H. Grzeschik und S. E. Antonarakis** (1997). Mutation in GLI3 in postaxial polydactyly type A.
Nat Genet **17**: 269-71.
- Ramirez-Weber, F. A. und T. B. Kornberg** (1999). Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs.
Cell **97**: 599-607.
- Rancourt, D. E., T. Tsuzuki und M. R. Capecchi** (1995). Genetic interaction between *hoxb-5* and *hoxb-6* is revealed by nonallelic noncomplementation.
Genes Dev **9**: 108-22.
- Rechsteiner, M. und S. W. Rogers** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis.
Trends Biochem Sci **21**: 267-71.
- Revzin, A., J. A. Ceglarek und M. M. Garner** (1986). Comparison of nucleic acid-protein interactions in solution and in polyacrylamide gels.
Anal Biochem **153**: 172-7.
- Riddle, R. D. u. C. T.** (1999). Wie Arme und Beine entstehen.
Spektrum der Wissenschaft: 62-68.
- Robbins, D. J., K. E. Nybakken, R. Kobayashi, J. C. Sisson, J. M. Bishop und P. P. Therond** (1997). Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein *costal2*.
Cell **90**: 225-34.
- Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, S. Lain, C. A. Midgley, D. P. Lane und R. T. Hay** (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53.
Embo J **18**: 6455-61.
- Rogers, S., R. Wells und M. Rechsteiner** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis.
Science **234**: 364-8.
- Ruiz i Altaba, A.** (1997). Catching a Gli-mouse of Hedgehog.
Cell **90**: 193-6.
- Ruiz i Altaba, A.** (1999a). Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer.
Trends Genet **15**: 418-25.
- Ruiz i Altaba, A.** (1999b). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease.
Development **126**: 3205-16.
- Ruppert, J. M., K. W. Kinzler, A. J. Wong, S. H. Bigner, F. T. Kao, M. L. Law, H. N. Seuanez, S. J. O'Brien und B. Vogelstein** (1988). The GLI-Kruppel family of human genes.
Mol Cell Biol **8**: 3104-13.
- Ruppert, J. M., B. Vogelstein, K. Arheden und K. W. Kinzler** (1990). GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity.
Mol Cell Biol **10**: 5408-15.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis** (1989). Molecular cloning - a laboratory manual.
Cold Spring Harbor, New York.

- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7.
- Sanz-Ezquerro, J. J. und C. Tickle** (2000). Autoregulation of Shh expression and Shh induction of cell death suggest a mechanism for modulating polarising activity during chick limb development. *Development* **127**: 4811-23.
- Sasaki, H., C. Hui, M. Nakafuku und H. Kondoh** (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* **124**: 1313-22.
- Sasaki, H., Y. Nishizaki, C. Hui, M. Nakafuku und H. Kondoh** (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**: 3915-24.
- Schimmang, T., M. Lemaistre, A. Vortkamp und U. Ruther** (1992). Expression of the zinc finger gene Gli3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt). *Development* **116**: 799-804.
- Schwartz, C., J. Locke, C. Nishida und T. B. Kornberg** (1995). Analysis of cubitus interruptus regulation in Drosophila embryos and imaginal disks. *Development* **121**: 1625-35.
- Schweiger, S., J. Foerster, T. Lehmann, V. Suckow, Y. A. Muller, G. Walter, T. Davies, H. Porter, H. van Bokhoven, P. W. Lunt, P. Traub und H. H. Ropers** (1999). The Opitz syndrome gene product, MID1, associates with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2794-9.
- Schweitzer, R., K. J. Vogan und C. J. Tabin** (2000). Similar expression and regulation of Gli2 and Gli3 in the chick limb bud. *Mech Dev* **98**: 171-4.
- Shen, Z., P. E. Pardington-Purtymun, J. C. Comeaux, R. K. Moyzis und D. J. Chen** (1996). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* **36**: 271-9.
- Shin, S. H., P. Kogerman, E. Lindstrom, R. Toftgard und L. G. Biesecker** (1999). GLI3 mutations in human disorders mimic Drosophila cubitus interruptus protein functions and localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2880-4.
- Sisson, J. C., K. S. Ho, K. Suyama und M. P. Scott** (1997). Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* **90**: 235-45.
- Skowyra, D., K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge und J. W. Harper** (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**: 209-19.
- Slusarski, D. C., C. K. Motzny und R. Holmgren** (1995). Mutations that alter the timing and pattern of cubitus interruptus gene expression in Drosophila melanogaster. *Genetics* **139**: 229-40.
- Smyth, I., M. A. Narang, T. Evans, C. Heimann, Y. Nakamura, G. Chenevix-Trench, T. Pietsch, C. Wicking und B. J. Wainwright** (1999). Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet* **8**: 291-7.
- Southgate, C. D. und M. R. Green** (1991). The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function. *Genes Dev* **5**: 2496-507.

- Stein, U., C. Eder, U. Karsten, W. Haensch, W. Walther und P. M. Schlag** (1999). GLI gene expression in bone and soft tissue sarcomas of adult patients correlates with tumor grade. *Cancer Res* **59**: 1890-5.
- Stone, D. L. und L. G. Biesecker** (1998). Identification of microsatellite markers tightly linked to the Gli2 putative zinc finger transcription factor gene. *Clin Genet* **53**: 488-9.
- Strutt, H., C. Thomas, Y. Nakano, D. Stark, B. Neave, A. M. Taylor und P. W. Ingham** (2001). Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol* **11**: 608-13.
- Studier, F. W. und B. A. Moffatt** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-30.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn und J. W. Dubendorff** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Summerbell, D., J. H. Lewis und L. Wolpert** (1973). Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* **244**: 492-6.
- Summerbell, D. und L. Wolpert** (1973). Precision of development in chick limb morphogenesis. *Nature* **244**: 228-30.
- Taipale, J. und P. A. Beachy** (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* **411**: 349-54.
- Takabatake, T., T. C. Takahashi, Y. Takabatake, K. Yamada, M. Ogawa und K. Takeshima** (2000). Distinct expression of two types of Xenopus Patched genes during early embryogenesis and hindlimb development. *Mech Dev* **98**: 99-104.
- Tanimura, A., S. Dan und M. Yoshida** (1998). Cloning of novel isoforms of the human Gli2 oncogene and their activities to enhance tax-dependent transcription of the human T-cell leukemia virus type 1 genome. *J Virol* **72**: 3958-64.
- Therond, P. P., J. D. Knight, T. B. Kornberg und J. M. Bishop** (1996). Phosphorylation of the fused protein kinase in response to signaling from hedgehog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4224-8.
- Topp, J.** (1997). Funktionelle Charakterisierung des Kandidatengens für das Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom, *GLI3*. Diplomarbeit im Studiengang Humanbiologie der Philipps-Universität Marburg.
- Villavicencio, E. H., D. O. Walterhouse und P. M. Iannaccone** (2000). The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* **67**: 1047-54.
- Vogel, G.** (1999). Many of modes of transport for an embryo's signals. *Science* **285**: 1003, 1005.
- von Mering, C. und K. Basler** (1999). Distinct and regulated activities of human Gli proteins in Drosophila. *Curr Biol* **9**: 1319-22.

Von Ohlen, T., D. Lessing, R. Nusse und J. E. Hooper (1997). Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2404-9.

Vortkamp, A., T. Franz, M. Gessler und K. H. Grzeschik (1992). Deletion of GLI3 supports the homology of the human Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) and the mouse mutant extra toes (Xt). *Mamm Genome* **3**: 461-3.

Vortkamp, A., M. Gessler und K. H. Grzeschik (1991). GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* **352**: 539-40.

Vortkamp, A., M. Gessler und K. H. Grzeschik (1995b). Identification of optimized target sequences for the GLI3 zinc finger protein. *DNA Cell Biol* **14**: 629-34.

Vortkamp, A., C. Heid, M. Gessler und K. H. Grzeschik (1995a). Isolation and characterization of a cosmid contig for the GCPS gene region. *Hum Genet* **95**: 82-8.

Vortkamp, A., K. Lee, B. Lanske, G. V. Segre, H. M. Kronenberg und C. J. Tabin (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **273**: 613-22.

Wagner, K., P. M. Kroisel und W. Rosenkranz (1990). Molecular and cytogenetic analysis in two patients with microdeletions of 7p and Greig syndrome: hemizygoty for PGAM2 and TCRG genes. *Genomics* **8**: 487-91.

Wallace, V. A. und M. C. Raff (1999). A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Development* **126**: 2901-9.

Wang, B., J. F. Fallon und P. A. Beachy (2000b). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**: 423-34.

Wang, G., K. Amanai, B. Wang und J. Jiang (2000a). Interactions with Costal2 and suppressor of fused regulate nuclear translocation and activity of cubitus interruptus. *Genes Dev* **14**: 2893-905.

Wang, Q. T. und R. A. Holmgren (1999). The subcellular localization and activity of Drosophila cubitus interruptus are regulated at multiple levels. *Development* **126**: 5097-106.

Werner, C. A., H. Dohner, S. Joos, L. H. Trumper, M. Baudis, T. F. Barth, G. Ott, P. Moller, P. Lichter und M. Bentz (1997). High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms. *Am J Pathol* **151**: 335-42.

Whitsett, J. (1998). A lungful of transcription factors. *Nat Genet* **20**: 7-8.

Wild, A. (1998). Molekulare Charakterisierung des Zinkfingergens *GLI3* und seiner Mutationen bei erblichen Entwicklungsstörungen. Dissertationsarbeit, Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.

Wild, A., M. Kalf-Suske, A. Vortkamp, D. Bornholdt, R. König und K. H. Grzeschik (1997). Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome. *Hum Mol Genet* **6**: 1979-84.

- Xie, J., M. Murone, S. M. Luoh, A. Ryan, Q. Gu, C. Zhang, J. M. Bonifas, C. W. Lam, M. Hynes, A. Goddard, A. Rosenthal, E. H. Epstein, Jr. und F. J. de Sauvage** (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma.
Nature **391**: 90-2.
- Yang, J. T., C. Z. Liu, E. H. Villavicencio, J. W. Yoon, D. Walterhouse und P. M. Iannaccone** (1997). Expression of human GLI in mice results in failure to thrive, early death, and patchy Hirschsprung-like gastrointestinal dilatation.
Mol Med **3**: 826-35.
- Yeh, E. T., L. Gong und T. Kamitani** (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles.
Gene **248**: 1-14.
- Yoon, J. W., C. Z. Liu, J. T. Yang, R. Swart, P. Iannaccone und D. Walterhouse** (1998). GLI activates transcription through a herpes simplex viral protein 16-like activation domain.
J Biol Chem **273**: 3496-501.
- Zarkower, D. und J. Hodgkin** (1992). Molecular analysis of the *C. elegans* sex-determining gene *tra-1*: a gene encoding two zinc finger proteins.
Cell **70**: 237-49.
- Zarkower, D. und J. Hodgkin** (1993). Zinc fingers in sex determination: only one of the two *C. elegans* *Tra-1* proteins binds DNA in vitro.
Nucleic Acids Res **21**: 3691-8.
- Zeller, R.** (1999). From classical mutations and concepts to molecular regulation and evolutionary models of development.
Cell Tissue Res **296**: 1-2.
- Zeng, X., J. A. Goetz, L. M. Suber, W. J. Scott, Jr., C. M. Schreiner und D. J. Robbins** (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling.
Nature **411**: 716-20.

7. Lebenslauf

Zur Person	Name	Martina Weßling
	Anschrift	Zeilstraße 45 35418 Großen-Buseck
	Geburtsdatum	12.03.1965
	Geburtsort	Rhede / Westfalen
Schulbildung	1971 – 1975	Overberg-Grundschule in Rhede
	1975 – 1976	Gudulahauptschule, Rhede
	1976 – 1982	Realschule Rhede
	1982 – 1985	Euregio Gymnasium, Bocholt
	Abschluß:	Allgemeinen Hochschulreife
Berufspraxis	1985 – 1986	Vorpraktikum zur Ausbildung der Medizinisch-technischen Assistentin in verschiedenen Laboratorien des Städtischen Klinikums Karlsruhe
Berufsausbildung	1986 – 1988	Staatlich anerkannte Fachschule für Med.-technische Laborassistenten
Berufstätigkeit	1988 – 1991	Medizinisch-technische Assistentin im Dr. von Haunerschen Kinderspital, München
Hochschulstudium	1991 – 1996	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
	Hauptfach:	Immunologie
	Nebenfächer:	Humangenetik, Virologie
	12/1995 – 12 / 1996	Diplomarbeit am Medizinischen Zentrum für Humangenetik der Universität Marburg
	Abschluß:	Diplom

Beschäftigung	5 / 1997 – 10 / 1997	Zentrum der Dermatologie und Venerologie (ZDV) des Klinikums der Johann- Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt / Main
Promotion	1 / 1998 – 8 / 2001	Medizinischen Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg Abt. Allgemeine Humangenetik, Prof. Dr. K.H. Grzeschik AG Greig, Prof. Dr. K.H. Grzeschik / Dr. M. Kalf-Suske

Publikationen

Originalarbeiten:

Kalf-Suske M., Wild A., Topp J., Wessling M., Jacobsen E.M., Bornholdt D., Engel H., Heuer, H., Aalfs C.M., Ausems M.G., Barone R., Herzog A., Heutink P., Homfray T., Gillissen-Kaesbach G., König R., Kunze J., Meinecke P., Müller D., Rizzo R., Strenge S., Superti-Furga, A., Grzeschik K.-H. (1999).

Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome.

Hum. Mol. Genet. **8**, 1769-1777.

Kalf-Suske, M., Wessling, M., Bornholdt, D., Heuer, H., Engel, H., Castellan, C., de Die-Smulder, C., Brunner, H.G., Dyack, S., Fuchs, S., Matthijs, G., and Grzeschik, K.-H. (2000)

Gene symbol GLI3 - Disease: Greig cephalopolysyndactyly syndrome.

Hum. Genet. **107**, 203.

Kalf-Suske, M., Wessling, M., Bornholdt, D., Heuer, H., Engel, H., Castellan, C., de Die-Smulder, C., Brunner, H.G., Dyack, S., Fuchs, S., Matthijs, G., and Grzeschik, K.-H. (2000)

Gene symbol GLI3 - Disease: Pallister-Hall syndrome.

Hum. Genet. **107**, 204.

Kongressbeiträge:

Faber, M., Schelbert, A., Wessling, M., Krebs, I., Kunz, J., Schwarz, K., Löwer, N., Ghebrai, E., Pongratz, J., Otto, M., Grzeschik, K.-H.

Integrating mapping of human chromosome 7p1-q1

Human Genome Meeting, Heidelberg, March 1996

Wessling, M., Kalff-Suske, M., Bornholdt, D., Engel, H., Wild, A., Topp, J., Bottani, A., Radhakrishna, U., Antonarakis, S., Grzeschik, K.-H.

GLI3 mutations cause different disorders of human development.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Nürnberg, März 1999 (Med. Genet. 1/1999: 211)

Grzeschik, K.-H., Kalff-Suske, M., Wessling, M., Bornholdt, D., Engel, H. and Heuer, H.

Mutations affecting different functional motifs of GLI3 associated with Greig cephalopolysyndactyly syndrome.

American Society of Human Genetics, San Francisco (USA), November 1999

Kalff-Suske, M., Wessling, M., Bornholdt, D., Engel, H. and Grzeschik, K.-H.

GLI3 mutations in human developmental disorders and their consequences for GLI3 protein function

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Lübeck, März 2000 (Med. Genet. 1/2000: 147)

Wessling, M., Kalff-Suske, M., Bornholdt, D., Engel, H. and Grzeschik, K.-H.

Functional consequences of GLI3 mutations in human developmental disorders.

Aussois Meeting on 'Limb Development and Regeneration', May 2000.

Wessling, M., Kalff-Suske, M., Bornholdt, D., Engel, H., Grzeschik, K.-H.

Functional implications of GLI3 mutations detected in human polydactylies

American Society of Human Genetics, Philadelphia (USA), October 2000

Kalff-Suske, M., Wessling, M., Bornholdt, D. and Grzeschik, K.-H.

GLI3 assoziierte Entwicklungsstörungen

4. Frankfurter Dysmorphologie-Workshop, Frankfurt/Main, November 2000

Vorträge:

Wessling, M.

Projektvorstellung, Arbeitsbericht und Vorstellung der Ziele

DFG Klausurtagungen Schwerpunktprogramm Molekulare Dysmorphogenese, Mainz (Oktober 1999 und April 2001)

Wessling, M.

Functional analysis of the transcription factor GLI3, a key component of the hedgehog pathway: Position and type of GLI3 mutations in human developmental defects: Functional and clinical implications.

Vorlesungsbeitrag im Rahmen des Vigoni Austauschprogramms mit der Università degli studi di Catania, Istituto di Biologia generale (September 1999)

Marburg, den 25.08.2001

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

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

Aumüller, Barth, Beato, Dressler, Elsässer, Engelhardt, Fischer, Frenking, Fruhstorfer, Fuhs, Gansauge, Garten, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Haustein, Herrler, Jungclas, Kaffarnik, Käuser, Kern, Kirchner, Klenk, Koch, Koolmann, Kunz, Lang, Lauer, Lefkowitz, M. Löffler, H. Löffler, Lührmann, Möröy, R. Müller, U. Müller, Niessing, Petzold, Radsak, Rogausch, Röhm, Schachtschabel, Schäfer, Schindler, Schulz, Schumacher, Sedlacek, Seifart, Seitz, Suske, Truss, Voigt, von Löw, Wagner, Waßmuth, Wesemann, Westermann, Westphal.

9. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-H. Grzeschik für die Überlassung des überaus interessanten und aktuellen Themas meiner Arbeit. Seine rege Anteilnahme, die vielen guten Ideen zum Thema und die, unter seiner Leitung angenehme Atmosphäre im Institut, bedürfen eines besonderen Dankes.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Martha Kalff-Suske für ihre stete Unterstützung, die überaus produktive Zusammenarbeit, ihre permanente Diskussionsbereitschaft und Geduld im Zusammenhang mit meiner Arbeit. Vor allem aber möchte ich mich für ihre Freude an der Wissenschaft bedanken, mit der sie mich angesteckt hat und die auch bei mir der Grund für die immer wiederkehrenden Fragen des Wieso?, Weshalb? und Warum? ist!

Dorothea Bornholdt gilt mein spezieller Dank für Hilfestellungen jeglicher Art während der Arbeit, aber vor allem für ihre konstruktiven Ratschläge. Ihre berufliche und private Unterstützung hat geholfen, manches Motivationstief zu überwinden und die Freude an der Arbeit neu zu entdecken.

Christian Kosan möchte ich danken, weil er neben beruflicher Hilfe vieler Art immer wesentlich zu der guten Arbeitsatmosphäre im Institut beigetragen hat.

Hartmut und P.D. Dr. Jürgen Kunz danke ich für die Unterstützung bei all meinen Fragen bezüglich des Computers und der Sequenzierungen.

Evelyn, Ina und Alice gilt mein Dank für die unkomplizierte und stets vorhandene Hilfe in beruflichen und privaten Fragen.

Allen anderen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes, ganz besonders aber Anja, Alex, Miranda, Eva, Elsa, Nicole und Frau Gimbel möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die persönliche Unterstützung danken.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Guntran Suske aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung gilt mein Dank für die vielen hilfreichen Tips bei der Durchführung einiger Experimente.

Prof. Dr. H. P. Elsässer danke ich für die Anteilnahme und Unterstützung bei der konfokalen Mikroskopie.

Frau Anke Holzbach und Evelyn Agricola danke ich für die wertvollen Tips bezüglich der Immunhistochemie.

Bei Martha und Anja möchte ich mich noch einmal extra bedanken, daß sie sich trotz ihrer knappen Zeit beim kritische Lesen und Kommentieren dieser Arbeit so engagiert haben. Ihre vielen guten Vorschläge waren oft der entscheidende Anstoß für die Entwicklung neuer Ideen.

Achim danke ich herzlichst, daß er einfach immer da ist, vor allem wenn ich ihn am dringendsten brauche. Er wurde nie müde, mir privat und beruflich den nötigen Halt und die hilfreiche Motivation zu geben, ohne die manche Situation nur schwer zu meistern gewesen wäre.

Besonders lieber Dank gebührt Ingrid für ihre Freundschaft und ihre Unterstützung in allem Lebenslagen.

Anni kann ich für ihr Interesse und ihre Hilfe in jeglicher Hinsicht, ohne die meine Promotion kaum möglich gewesen wäre, nicht genug danken.

Dank an Konnie, Hubertus, Isabel, Ruth und Rudolf dafür, daß sie Anteil nehmen, wann immer es nötig ist.

Meinen Eltern, aber ganz besonders meinem Vater danke ich für den Glauben an mich und meine Fähigkeiten.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

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

„Funktionelle Analysen von Genen (*GLI*), die an der Entwicklung der Gliedmaßen beteiligt sind“

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

Marburg, den 25.08.2001

(Martina Weßling)